

**Molekulargenetische und
zytogenetische Untersuchungen zur
paternalen Introgression beim
gynogenetischen Amazonenkärpfling
*Poecilia formosa***

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dunja K. Lamatsch

aus

Kempen/Huels

Würzburg im Januar 2001

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Goebel

Gutachter: Prof. Dr. M. Scharl

Gutachter: Prof. Dr. M. Schmid

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für Jürgen

„ ... there is always some danger in using sperm: even if you do not want, you run the risk of being fertilized...“

A. Dubois (1990)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Asexuelle Fortpflanzungsstrategien.....	1
1.2	Sexualität versus Asexualität.....	4
1.3	<i>Poecilia formosa</i> – ein unisexueller Vertebrat.....	6
1.4	Paternale Introgression bei <i>P. formosa</i>	9
1.5	Ziel der Arbeit.....	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Fische und Haltungsbedingungen	12
2.2	Lichtmikroskopie und Fotodokumentation	13
2.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	14
3	Molekulare Charakterisierung der Mikrochromosomen	15
3.1	Einleitung	15
3.1.1	Paternale Introgression in Form von Mikrochromosomen	16
3.1.2	Das <i>Xiphophorus</i> -Melanom-System	19
3.1.3	Mikrochromosomen als Ursache für Pigmentzelltumore	20
3.1.4	<i>P. formosa</i> als Modellsystem	22
3.1.5	Fragestellung	22
3.2	Material und Methoden.....	23
3.2.1	Fische	23
3.2.2	Multilocus DNA-Fingerprint	23
3.2.3	Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	24
3.2.4	Southern Blot-Analyse	30
3.3	Ergebnisse.....	33

3.3.1	Multilocus DNA-Fingerprint Untersuchungen zum Nachweis paternaler Introgression	33
3.3.2	AFLP	34
3.4	Diskussion.....	40
3.4.1	Methoden zur Isolierung ganzer Mikrochromosomen	40
3.4.2	Methoden zur Isolierung mikrochromosomaler Sequenzen	43
3.4.3	Evolution von Mikrochromosomen	44
3.4.4	Ausblick	45
4	<u>Paternale Introgression bei <i>Poecilia formosa</i> in natürlichen Populationen unter besonderer Berücksichtigung von Triploidie</u>	46
4.1	Einleitung	46
4.1.1	Paternale Introgression bei <i>P. formosa</i>	49
4.1.2	Triploidie	49
4.1.3	Koexistenz von <i>P. formosa</i> und ihren Wirten	52
4.1.4	Klonale Variabilität	52
4.1.5	Fragestellung	53
4.2	Material und Methoden.....	55
4.2.1	Fische	55
4.2.2	Größenmessung der Fische	55
4.2.3	Bestimmung des DNA-Gehalts mittels Durchflußzytometrie	55
4.2.4	Präparation von Mitose-Chromosomen aus Fischorganen	56
4.2.5	Isolierung hochmolekularer DNA	57
4.2.6	Multilocus DNA-Fingerprint	58
4.3	Ergebnisse	62
4.3.1	Analyse chromosomaler Klone	62
4.3.2	Etablierung einer Methode zur minimal-invasiven Bestimmung des Ploidiegrades	63

4.3.3	Durchflußzytometrische Analyse von Individuen aus natürlichen Populationen	65
4.3.4	Anpassen der Methode an Probenentnahme im Freiland	68
4.3.5	Durchflußzytometrische Analyse von Flossenmaterial aus natürlichen Populationen	68
4.3.6	Identifizierung eines Mosaiktieres	71
4.3.7	Untersuchung der Nachkommenzahl diploider und triploider Wildfänge	71
4.3.8	Vergleichende Größenmessungen diploider und triploider Jungtiere	72
4.3.9	Analyse der klonalen Variabilität	73
4.4	Diskussion.....	78
4.4.1	Etablierung einer effizienten Screeningmethode	78
4.4.2	Häufigkeit diploider und triploider <i>P. formosa</i> in natürlichen Populationen	78
4.4.3	Klonale Variabilität	81
4.4.4	Mosaiktier	81
4.4.5	Evolutive Bedeutung von Polyploidie	84
4.4.6	Ausblick	85
5	<u>Triploide männliche Tiere in einem Mikrochromosomen-tragenden Stamm von <i>Poecilia formosa</i></u>	87
5.1	Einleitung und experimentelle Fragestellung.....	87
5.1.1	Primäre und sekundäre Geschlechtsmerkmale	88
5.1.2	Meiotische Chromosomen der männlichen Keimbahn	91
5.1.3	Sexualverhalten	93
5.1.4	Fertilität	94
5.2	Material und Methoden.....	95
5.2.1	Fische	95

5.2.2	Fertilität	96
5.2.3	Morphologie	96
5.2.4	Sexualverhalten	97
5.2.5	Bestimmung des DNA-Gehalts mittels Durchflußzytometrie	101
5.2.6	Präparation von Mitose-Chromosomen aus Fischorganen	101
5.2.7	Isolierung hochmolekularer DNA	101
5.2.8	Präparation des synaptonemalen Komplexes	101
5.2.9	Präparation von Meiose-Chromosomen aus Testisgewebe	104
5.2.10	Gewinnen von Spermien	104
5.2.11	Multilocus DNA-Fingerprint	104
5.2.12	Histologie der Gonaden	105
5.3	Ergebnisse	106
5.3.1	Habitus	106
5.3.2	DNA-Gehalt	107
5.3.3	Analyse mitotischer Chromosomen	110
5.3.4	Männchen im optischen Wahlversuch	111
5.3.5	Männchen in Vollkontakt-Versuchen	113
5.3.6	Morphologie des Begattungsorgans und seiner akzessorischen Strukturen	117
5.3.7	Gonadenstruktur	122
5.3.8	Paarung meiotischer Chromosomen	123
5.3.9	Fertilität der <i>P. formosa</i> -Männchen	125
5.3.10	Herkunft des dritten Genoms	126
5.4	Diskussion.....	128
5.4.1	Triploidie und ihre Folgen für die Meiose	128
5.4.2	Morphologie	131
5.4.3	Sexualverhalten	131
5.4.4	Geschlechtsdeterminierung bei Vertebraten	133

5.4.5	Geschlechtsdeterminierung bei <i>P. formosa</i>	135
5.4.6	Theorie zur Entstehung triploider männlicher Tiere bei <i>P. formosa</i>	135
5.4.7	Ausblick	139
6	Diskussion	141
7	Zusammenfassung	148
8	Summary	151
9	Abkürzungen	154
10	Literatur	156
11	Publikationen	170
12	Danke!	171
13	Lebenslauf	173
14	Eidesstattliche Erklärung	175

1 Einleitung

Warum pflanzen sich Organismen sexuell fort? Biologen stimmen weitgehend darin überein, daß diese Frage keineswegs befriedigend beantwortet ist (Bell, 1982; Stearns, 1983; Kondrashov, 1993). Obwohl es sich bei sexueller Reproduktion um das vorherrschende Prinzip im Tierreich handelt, gibt es durchaus eine Reihe von alternativen Reproduktionsstrategien.

1.1 Asexuelle Fortpflanzungsstrategien

Diese Alternativen zur sexuellen Fortpflanzung treten meist als Folge von interspezifischer Hybridisierung auf: Die Kombination zweier heterospezifischer Genome hat in diesen Fällen oft eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten von Weibchen zur Folge und verändert die Gametogenese in der Weise, daß die Hybrid-Weibchen Eizellen ohne genetische Rekombination bilden. Dadurch entstehen unisexuelle Linien (Dawley, 1989). Die wichtigsten asexuellen Fortpflanzungsmechanismen sind (1) die echte Parthenogenese (Jungfernzeugung) und (2) die spermienabhängige Parthenogenese. Zur spermienabhängigen Parthenogenese werden die (2a) Gynogenese und (2b) Hybridogenese gezählt.

Bei der Parthenogenese (Abbildung 1) werden die Oozyten ohne genetische Rekombination und Reduktionsteilung gebildet. Diese entwickeln sich ohne Spermien zu Nachkommen, die untereinander sowie mit der Mutter genetisch identisch sind. Parthenogenetische Vertebraten sind ausschließlich unter den Reptilien zu finden, wie z.B. einige *Cnemidophorus*- und *Lacerta*-Arten.

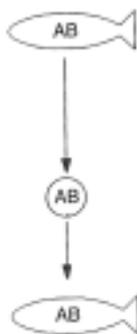


Abbildung 1: Parthenogenese. Das Hybrid-Genom (AB) wird ohne Rekombination und ohne Beteiligung von Spermien klonal an die Nachkommen weitergegeben.

Die Gynogenese (Abbildung 2) stellt eine Sonderform der Parthenogenese dar, bei der die unreduzierten Oozyten durch Spermien dazu angeregt werden, die Embryogenese zu beginnen. Dabei kommt es nicht zur Karyogamie, so daß die Nachkommen ohne Beteiligung paternaler Gene klonal sind. Gynogenetische Vertebraten finden sich bei Fischen, wie z.B. *Poeciliopsis 2 monacha-lucida* bzw. *Poeciliopsis monacha-2 lucida*, *Poecilia formosa*, *Carassius auratus gibelo* und *C. auratus langsdorfii*, sowie *Phoxinus eos-neogaeus*.

Durch das Eindringen des Spermiums in die Oozyte besteht jedoch bei spermienabhängiger Parthenogenese – trotz bestimmter Ausschlußmechanismen – immer die Möglichkeit, daß das väterliche Genom vollkommen oder partiell an der Bildung der Nachkommen beteiligt ist (paternale Introgression). Im Falle einer Verschmelzung des unreduzierten Oozytenkerns und des haploiden Spermienkerns (Karyogamie) kann es leicht zu einer Erhöhung des Ploidiegrades kommen (Dawley, 1989).

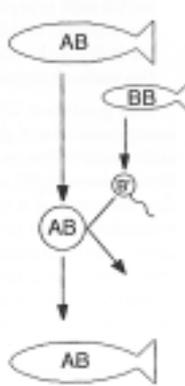


Abbildung 2: Gynogenese. Die unreduzierten Oozyten (AB) entwickeln sich durch Stimulation von Spermien (B') parthenogenetisch.

Hybridogenese (Abbildung 3) dagegen zeigt einige Merkmale sexueller Reproduktion. Bei einem diploiden hybriden Organismus wird immer der Chromosomensatz einer Elternart eliminiert, so daß nur der Chromosomensatz der anderen Elternart unverändert in die Oozyte gelangt. Die Oozyten werden dann normalerweise von Spermien der Art befruchtet, deren Chromosomensatz eliminiert wurde. Damit wird der Hybridcharakter bei den Nachkommen wieder hergestellt. Diese Fortpflanzungsweise wird als hemiklonal bezeichnet, da ein Genom klonal, das andere hingegen sexuell vererbt wird. Beispiele für eine hybridogenetische Fortpflanzungsweisen finden sich bei Amphibien wie z.B. *Rana esculenta* oder Fischen wie z.B. *Poeciliopsis monacha-lucida* und *Rutilus alburnoides*.

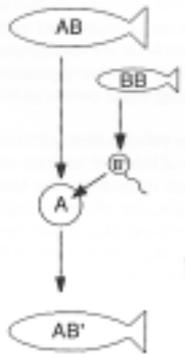


Abbildung 3: Hybridogenese. Ein Genom (A) wird klonal weitergegeben, das andere (B) eliminiert. Durch Befruchtung kommt ein neues Genom (B') hinzu.

Dabei geht aus der Terminologie nicht eindeutig hervor, welcher zytogenetische Mechanismus einer asexuellen Fortpflanzung zugrunde liegt. Ein wichtiges Ziel von Meiose und Befruchtung bei der sexuellen Fortpflanzung ist, durch Rekombination genetische Variabilität zu schaffen. Dies geschieht sowohl (1) beim Crossing-over, (2) bei der zufälligen Verteilung der Homologen auf die Gameten, sowie (3) bei der Verschmelzung von Gameten. Bei den asexuellen Reproduktionsmodi werden entweder einzelne Schritte (Hybridogenese: 1 und 2) oder aber alle Schritte (Parthenogenese, Gynogenese) unterdrückt.

Apomixis bezeichnet die mitotische (ameiotische) Entwicklung von Eizellen (für einen Überblick siehe Suomalainen et al., 1987). Es findet kein Crossing-over und keine Reduktionsteilung statt, was zur Folge hat, daß die Oozyten den somatischen Ploidiegrad aufweisen und deshalb keiner Befruchtung zur Aufrechterhaltung der somatischen Chromosomenzahl bedürfen (z.B. *P. formosa*, Monaco et al., 1984). Allein Mutationen dienen als Quelle für genetische Variation.

Prämeiotische Endomitose (Automixis) kommt zu dem gleichen Ergebnis wie Apomixis, allerdings indem sich die Chromosomen vor Eintritt in die Meiose verdoppeln und anschließend eine Reduktionsteilung stattfindet. Weder die Paarung identischer Chromosomen zu sog. Pseudobivalenten, noch die Segregation der identischen Chromosomen schafft genetische Rekombination. Wenn die Zellen in die Meiose II eintreten, zeigt sich das gleiche Bild wie bei apomiktischer Produktion der Eizellen. Auf diese Weise produzieren z.B. *Cnemidophorus uniparens* (Cuellar,

1971) sowie *Poeciliopsis 2 monacha-lucida* und *Poeciliopsis monacha-2 lucida* (Cimino, 1972) unreduzierte Oozyten.

Durch Genomeliminierung entstehen reduzierte Oozyten, ohne daß Crossing-over oder Segregation stattfinden. Da das gesamte Genom des einen Elternteils ausgeschlossen wurde, bedarf es der Befruchtung der reduzierten Eizelle, um den Hybridcharakter wieder herzustellen. Dabei sind mindestens zwei Mechanismen möglich. Bei *Poeciliopsis monacha-lucida* werden in der Meiose I nur die *monacha*-Chromosomen von dem Spindelapparat erkannt und zu einem der Pole gezogen. Die *lucida*-Chromosomen werden resorbiert. Bei der zweiten meiotischen Teilung entstehen folglich haploide Eizellen, die nur *monacha*-Chromosomen aufweisen, welche keinerlei genetische Rekombination erfahren haben. Bei diploiden *Rana esculenta* wird allerdings nach der Genomeliminierung das verbleibende elterliche Genom endomitotisch verdoppelt (s.o.) und tritt so in die Meiose ein. Als Folge entstehen wiederum haploide Eizellen mit nur einem elterlichen Genom, das keine Rekombination erfahren hat (Graf & Polls Pelaz, 1989).

1.2 Sexualität versus Asexualität

Die Frage nach der Entstehung und Beibehaltung von Sexualität ist in der Biologie von zentraler Bedeutung (Bell, 1982; Williams, 1992; Kondrashov, 1993; Redfield, 1994). Da man sich von einer vergleichenden Betrachtungsweise der sexuellen mit der nicht-sexuellen Fortpflanzung wichtige Aufschlüsse erwartet, werden in diesem Zusammenhang seit langem die Vor- und Nachteile asexueller Fortpflanzung diskutiert.

Ein offensichtlicher Vorteil ist, daß die Vermehrung asexueller Arten deutlich schneller erfolgt als die von sexuellen Arten, da keine Männchen produziert werden müssen (Maynard-Smith, 1978).

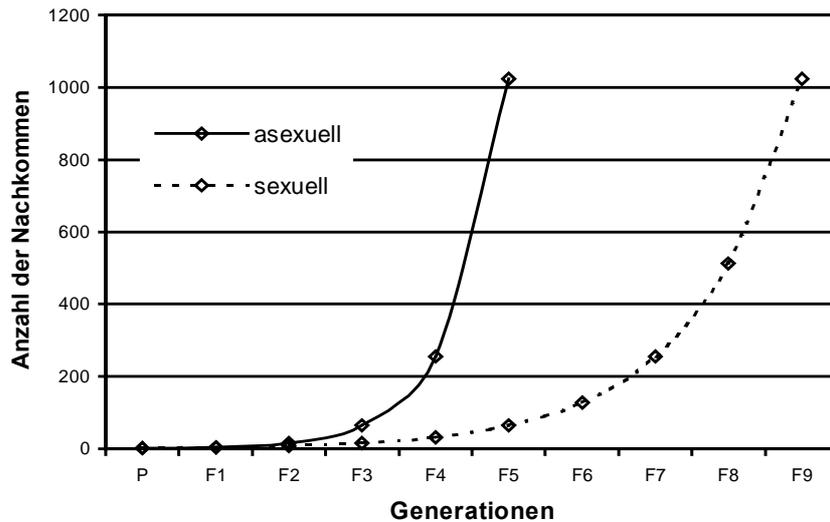


Abbildung 4: Ausgehend von einem Gründerweibchen wird bei einer Nachkommenzahl von je vier Tieren eine Populationsgröße von 1024 Individuen in einer asexuellen Population bereits nach 5 Generationen, in einer sexuellen Population erst nach 9 Generationen erreicht. Dieses Prinzip wird als „two-fold cost of sex“ bezeichnet.

Ein weiterer Vorteil ist, daß asexuelle Organismen ihre gut angepassten Gene zu 100% an ihre Nachkommen weitergeben können. Bei sexueller Fortpflanzung hingegen werden durch Rekombination zwar immer wieder neue Genkombinationen gebildet, es können dadurch aber auch besonders gute Kombinationen wieder auseinandergerissen werden („cost of meiosis“, Williams, 1975). Der Verwandtschaftsgrad mit den Nachkommen beträgt also nur 50%, womit genau die Genkombination, die für den Erfolg dieses Individuum verantwortlich ist, vielleicht nicht an die Nachkommen weitergegeben werden kann.

Daher würde man annehmen, daß die asexuelle Fortpflanzung sich in natürlichen Populationen durchsetzen müßte. Dem ist jedoch nicht so. Im Gegenteil ist Sexualität die vorherrschende Fortpflanzungsstrategie. Um dieses Paradox zu erklären, wurden verschiedene theoretische Modelle aufgestellt, die den kurzfristigen Vorteilen langfristige Nachteile gegenüberstellen. Die Hauptmodelle besagen, daß sich aufgrund fehlender genetischer Rekombinationsprozesse schädliche Mutationen im Laufe der Generationen anhäufen („Muller’s ratchet“, Muller, 1964) und schnelle Anpassung an veränderte Umweltbedingungen (Williams, 1966) oder neue Abwehrstrategien gegen Parasiten („Red Queen“-

Hypothese, Bell, 1982) erschwert werden. Insgesamt gibt es über 20 verschiedene Hypothesen für die Evolution von Rekombination (Kondrashov, 1993).

Selbst wenn die langfristigen Nachteile von Asexualität zum Aussterben der Linie führen, muß angenommen werden, daß die kurzfristigen Vorteile von Asexualität dazu führen, daß diese sich erst einmal etablieren kann. Doncaster et al. (2000) schlagen jedoch anhand eines populationsdynamischen Modells vor, daß ab einer bestimmten Zuwachsrate die intraspezifische Konkurrenz so groß wird, daß eine eindringende asexuelle Population sich selbst stärker hemmt als die sexuelle. Voraussetzung dafür ist allerdings, daß die ökologischen Nischen beider Arten nicht identisch sind. Dies gäbe dann der sexuellen Form genug Zeit, um die oben genannten Vorteile gegenüber der asexuellen auszuprägen.

Bisher wurden die verschiedenen Theorien immer als konkurrierend angesehen. Dabei muß jede Theorie extreme Annahmen machen, um die Beibehaltung von Sexualität erklären zu können. West et al. (1999) zeigen dagegen in einem pluralistischen Ansatz, daß durchaus mehrere dieser Faktoren gleichzeitig bzw. ergänzend wirken können.

Die sich im Genom anhäufenden schädlichen Mutationen aufgrund fehlender Rekombination sollen nach einigen Generationen zum Aussterben der asexuellen Art führen (Muller, 1964; Lynch & Gabriel, 1990). Dem widersprechen sog. „ancient asexuals“, Arten, die schon seit Millionen von Jahren ohne Anzeichen sexueller Fortpflanzung existieren. Dies sind (1) bdelloide Rotatorien, (2) Ostracoden (70 Mio Jahre) sowie (3) parthenogenetische Artemien (30-40 Mio Jahre). Dies stellt die Theoretiker vor erhebliche Probleme (Judson & Normark, 1996).

1.3 *Poecilia formosa* – ein unisexueller Vertebrat

Der Amazonenkärpfling (*Poecilia formosa*) gehört zur Familie der lebendgebärenden Zahnkarpfen (*Poeciliidae*, Teleostei) und wurde ursprünglich 1859 von Girard beschrieben. Sein Trivialname leitet sich aus der griechischen Mythologie ab: Die Amazonen waren ein Stamm männerloser Kämpferinnen.



Abbildung 5: „Amazone zu Pferd“,
Bronze von Louis Tuillon (1895)



Abbildung 6: *Poecilia formosa*

Tatsächlich gibt es bei *P. formosa* (fast) ausschließlich Weibchen, was erstmals von Hubbs & Hubbs (1932) erkannt wurde. Dies ist die Folge eines besonderen Fortpflanzungsmechanismus, der „Gynogenese“ (siehe 1.1). Die Weibchen produzieren apomiktisch diploide Eizellen (Rasch et al., 1982; Monaco et al., 1984). Apomixis impliziert (1) die Unterdrückung der ersten meiotischen Teilung, die durch eine mitotische Teilung ersetzt wird, (2) daß keine Bivalente gebildet werden (asynaptisch) und daß (3) keine Reduktion der Chromosomenzahl stattfindet. Spermien dienen nur als physiologische Stimuli, um die Embryogenese zu initiieren, ohne daß das väterliche Erbgut in die nächste Generation geht. Nach dem Eindringen des Spermiums in die Oozyte findet keine Karyogamie statt. Die Töchter sind demnach alle mit ihrer Mutter genetisch identisch. Diese klonale Fortpflanzung läßt sich mit Hilfe mehrerer Techniken nachweisen (Hubbs & Hubbs, 1946a; Hubbs & Hubbs, 1946b; Kallman, 1962a; Turner et al., 1980; Turner, 1982). Am überzeugendsten gelingt dies mit dem genetischen Fingerabdruck (Schartl et al., 1990; Turner et al., 1990; Schartl et al., 1991).

Ihre Spermienabhängigkeit zwingt die Weibchen, sympatrisch vorkommende Männchen verwandter Arten als Spermiodonatoren zu parasitieren (Kleptospermie). Im nördlichen Verbreitungsgebiet ist dies der Breitflossenkärpfling, *P.*

latipinna, im südlichen überwiegend der Atlantikkärpfling, *P. mexicana* (Abbildung 7). In der Gegend um Tampico kommen zum Teil alle drei Arten sympatrisch vor (Darnell & Abramoff, 1968). Da jedoch keine Syngamie stattfindet, müssen die Spermien nicht genetisch kompatibel sein, was das Spektrum möglicher Spermiodonatoren erweitert. Im Labor kann *P. formosa* daher auch mit einigen anderen Arten der Gattung *Poecilia* vermehrt werden (Hubbs & Hubbs, 1946a; Hubbs & Hubbs, 1946b; Hubbs, 1955; Haskins et al., 1960; Schlupp, 1995). Die Verbreitungsgebiete der Wirtsarten sind sehr viel größer als die des Amazonenkärpflings. Es ist unklar, warum *P. formosa* dieses Potential nicht nutzt.



Abbildung 7: Verbreitung von *P. formosa*, *P. mexicana* und *P. latipinna*. Das Verbreitungsgebiet von *P. formosa* ist schraffiert dargestellt. In Süd-Texas / Nord-Mexiko kommt *P. formosa* sympatrisch mit *P. latipinna* vor, im südlichen Verbreitungsgebiet mit *P. mexicana*. In der Gegend von Tampico (Mx) kommen teilweise alle drei Arten sympatrisch vor. Verändert nach Schlupp (1995).

Für die Wirtsmännchen sind die Kopulationen mit *P. formosa* jedoch mit „Kosten“ verbunden, ohne daß sie einen direkten „Nutzen“ in Form von Nachkommen haben. Solche Kosten sind zum Beispiel der Aufwand für die produzierten Spermienpakete, für die Balz oder für die verpaßten Gelegenheiten zur Kopulation mit arteigenen Weibchen. Verhaltensphysiologische Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß die Männchen der beiden Wirtsarten sehr wohl in der Lage sind, *P. formosa* von den arteigenen Weibchen zu unterscheiden und im optischen Wahlversuch auch die arteigenen Weibchen bevorzugen (Schlupp et al., 1991; Ryan et al., 1996). Mittels chemischer Signale und durch aktives Eingreifen in das intraspezifische Balzverhalten der Wirte wird diese natürliche Präferenz von den *P. formosa*-Weibchen unterlaufen, um so die für das Überleben der Art notwendigen heterospezifischen Kopulationen zu erzwingen (Schlupp et al., 1991; Foran & Ryan, 1994).

Laboruntersuchungen zum Paarungsverhalten von *P. latipinna* ergaben sogar, daß die interspezifische Interaktion für die Männchen adaptiv sein könnte. Die Grundlage dafür lieferten Studien an sexuellen Arten, bei denen gezeigt wurde, daß Weibchen die Wahlentscheidung anderer Weibchen kopieren („mate copying“, Dugatkin & Godin, 1992). Im *P. formosa*-Komplex haben Schlupp et al. (1994) gezeigt, daß die sexuellen *P. latipinna*-Männchen von Kopulation mit *P. formosa* einen Nutzen haben, weil sie dadurch für die arteigenen Weibchen attraktiver werden.

Wie bei den meisten unisexuellen Vertebraten (Vrijenhoek, 1989) handelt es sich beim Amazonenkärpfling um eine Hybridart, die wahrscheinlich auf ein einziges Hybridisierungsereignis zurückgeht (Turner, 1982). Dabei stellt *P. mexicana* die mütterlichen Stammform dar, *P. latipinna* bzw. ein Vertreter des *P. latipinna* / *P. velifera* – Komplexes die väterliche (Schartl et al., 1995a).

P. formosa ist eine in Nordmexiko außerordentlich erfolgreiche Spezies, die an vielen Stellen sehr hohe Individuenzahlen erreicht. Balsano et al. (1985) detektierten 32 % der gefangenen *Poecilia*-Weibchen als gynogenetisch.

1.4 Paternale Introgression bei *P. formosa*

Überraschenderweise ergaben Abschätzungen aufgrund molekularphylogenetischer Untersuchungen (Schartl et al., 1995a), daß *P. formosa* wesentlich älter ist als dies theoretische Überlegungen (Lynch & Gabriel, 1990) auf der Basis von „Muller's

ratchet“ erwarten ließen. Ähnliche Befunde wurden auch für andere asexuelle Wirbeltierarten erhalten, wie z.B. *Poeciliopsis* (Quattro et al., 1992) oder *Ambystoma* (Hedges et al., 1992; Spolsky et al., 1992). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen bei *P. formosa* ist, daß offensichtlich in seltenen Fällen väterliches Erbmaterial an die Nachkommen weitergegeben werden kann (paternale Introgression).

Triploidie

Kommt es aufgrund von Karyogamie zu einer tatsächlichen Befruchtung der diploiden Oozyte durch das haploide Spermium, entstehen triploide Tiere von *P. formosa* (Kapitel 4). Triploide Weibchen aus dem natürlichen Habitat sind normalerweise fertil und vermehren sich ebenfalls gynogenetisch. Die Nachkommen sind daher ebenfalls triploid. (Rasch & Balsano, 1974; Lamatsch et al., in Vorbereitung).

Mikrochromosomen

In anderen Fällen verbleiben offensichtlich nach der Aktivierung durch das artfremde Spermium geringe DNA-Menge in der Oozyte, die in den Kern aufgenommen werden und dann als Mikrochromosomen im Karyotyp zu identifizieren sind (Schartl et al., 1995b; und Kapitel 4). Stammen die durch paternale Introgression entstandenen Mikrochromosomen von einem „Black Molly“, einer schwarzen Zuchtform der Gattung *Poecilia* mit dominanten Genen für Schwarzfärbung (Schröder, 1964), so können die Nachkommen ebenfalls ein schwarzes Pigmentmuster ausprägen. Ausgehend von diesen Pigmentflecken entwickelt ein Teil der Tiere maligne Melanome (Schartl et al., 1997 und Kapitel 3).

Der Mechanismus, der normalerweise bei gynogenetischer Fortpflanzung das Erbmaterial des Spermiums aus der Oozyte entfernt, ist demnach in seltenen Fällen fehlerhaft, so daß das väterliche Genom bzw. ein Teil des väterlichen Genoms tatsächlich an die Nachkommen weitergegeben wird. Über beide Wege könnte also „frisches“ genetisches Material in die Oozyte eingeschleust werden. Interessanterweise wurden bislang keine weiteren Formen paternaler Introgression detektiert. Allerdings können beide Ereignisse kombiniert vorliegen.

Triploide Mikrochromosomenträger

Wenn die Nachkommen gefleckter Mikrochromosomen-Träger ein weiteres Genom durch paternale Introgression von einem wildtypisch gefärbten Männchen erhalten, so entwickeln sie sich zu Männchen (Lamatsch et al., 2000a und Kapitel 5). Schlupp et al. (1992; 1998) konnten zeigen, daß die Gene, die für die Ausprägung des männlichen Phänotyps verantwortlich sind, trotz fehlendem Selektionsdruck noch intakt sind und durch bestimmte Stimuli (z.B. männliche Hormongaben) exprimiert werden können.

1.5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten die oben genannten Formen paternaler Introgression sowie deren evolutive Konsequenzen am Beispiel des gynogenetischen Amazonenkärpflings (*P. formosa*) untersucht werden.

Dazu sollte im ersten Teil der Arbeit (Kapitel 3) eine Methode etabliert werden, die es ermöglicht die vom Black Molly stammenden Mikrochromosomen bzw. mikrochromosomale Sequenzen zu isolieren. Damit wäre die Grundlage für weitere Untersuchungen geschaffen, um die Gene charakterisieren zu können, die für die Ausbildung maligner Melanome bei *P. formosa* verantwortlich sind. Außerdem könnten damit funktionelle Daten erhalten werden, um die evolutive Bedeutung der Mikrochromosomen beurteilen zu können.

Im zweiten Teil der Arbeit (Kapitel 4) sollten die Formen und Häufigkeiten von paternaler Introgression in natürlichen Populationen verschiedener Fundorte untersucht werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf triploide Individuen gelegt werden, die mit einer eigens dazu entwickelten, minimal-invasiven Methode identifiziert werden können. DNA-Fingerprints sollten über die klonale Variabilität von triploiden gegenüber diploiden Individuen Aufschluß geben.

Im dritten Teil der Arbeit (Kapitel 5) sollte das Auftreten triploider, phänotypisch männlicher Individuen in den Mikrochromosomen-tragenden Laborstämmen von *P. formosa* untersucht werden. Anhand von Verhaltensexperimenten sowie zytogenetischen und molekulargenetischen Analysen sollte untersucht werden, inwieweit es sich bei diesen Individuen – im Vergleich zu Männchen gonochoristischer (zweigeschlechtlicher) Arten – um vollständige Männchen handelte.

2 Material und Methoden

2.1 Fische und Haltungsbedingungen

Die verwendeten Fische der Art *P. formosa* waren entweder Wildfänge von den in Abbildung 8 und Tabelle 1 dargestellten Fundorten in Mexiko oder Nachzuchten von solchen Wildfängen.

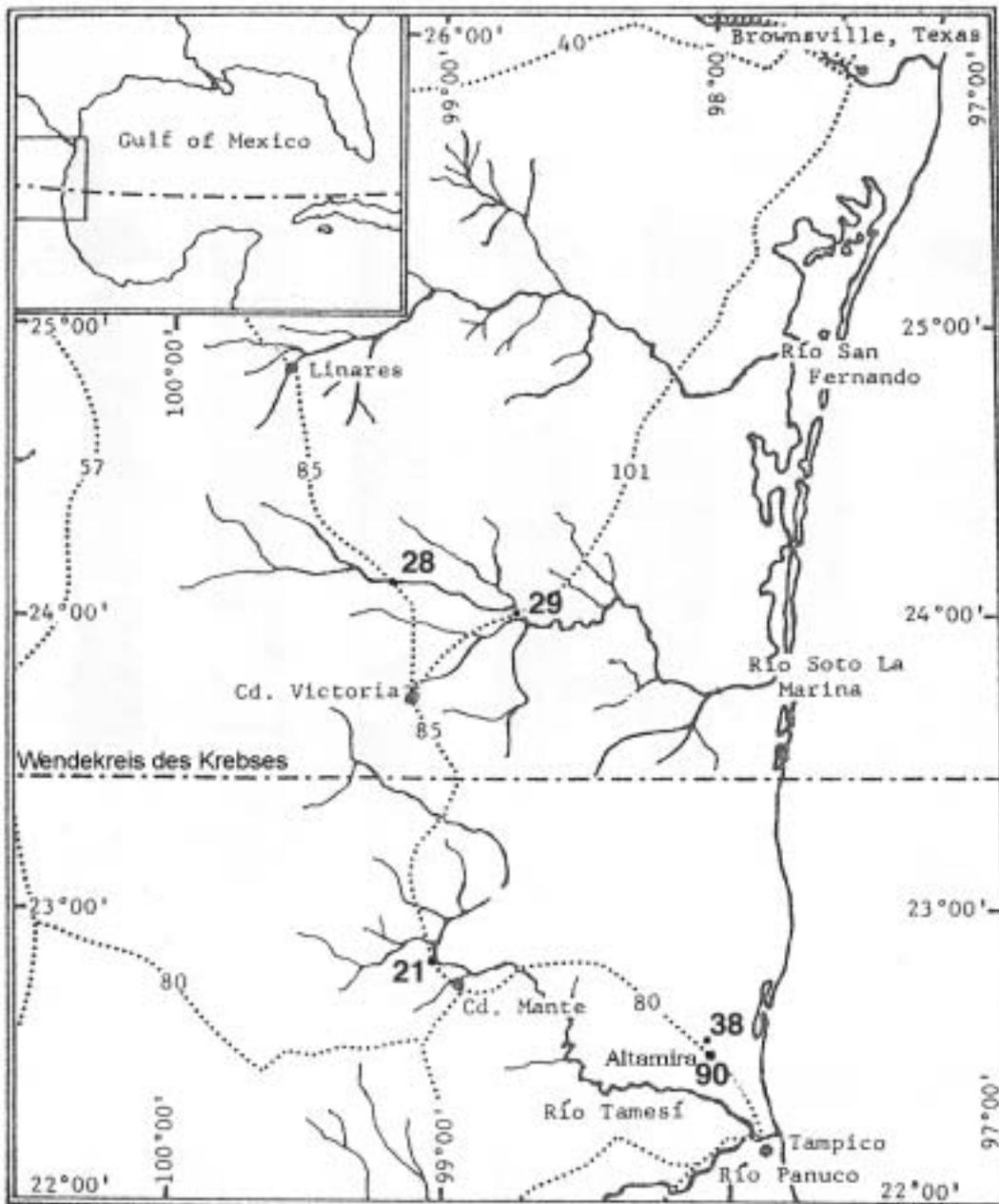


Abbildung 8: Fundorte der verwendeten Fische. F.O. 28 und 29 liegen am Río Purificación, F.O. 21 am Río Tamesí, F.O. 38 und 90 an der Laguna Champaxan. Die gepunkteten Linien stellen Bundesstraßen dar (nach Balsano et al., 1972).

Die *P. formosa* Wildfänge wurden entweder direkt nach Ankunft im Labor zur Analyse herangezogen oder zur Weiterzucht mit Black Molly-, *P. mexicana*- oder Liberty Molly-Männchen als Spermiodonatoren verpaart. Die zur Zucht der Hybriden verwendeten *P. latipinna* und *P. mexicana* stammen von dem Fundort 38 bzw. von Fundort 90. Der Angabe des Fundorts (F.O.) wird jeweils das Jahr der Sammelreise beigefügt, z.B. 28/96.

Tabelle 1: Fundorte von *P. formosa* im Nordosten Mexikos.

Fundort-Nr.	Beschreibung	GPS	Wirt
21	Entwässerungsgraben 11 km	N 19°2'38''	<i>P. mexicana</i>
	nördl. von Ciudad Mante	W 96°23'59.3''	<i>P. latipunctata</i>
28	Río Purificación,	N 24°4'49.5''	<i>P. mexicana</i>
	Barretal	W 99°7'30.1''	
29	Río Purificación,	N 24°2'35.6''	<i>P. mexicana</i>
	Nuevo Padilla	W 98°54'15.9''	
38	Laguna Champaxan bei Altamira		<i>P. mexicana</i>
90	Altamira, BASF-Ausfluß		<i>P. mexicana</i>

Im Labor wurden die Tiere unter Standardbedingungen gehalten wie von Kallman (1975) für *Xiphophorus* beschrieben: Die Aquarien besaßen eine Größe von 25-600l, in denen die Fische in Populationen von 40 bis 100 Individuen gehalten wurden. Die Wassertemperatur betrug 25-27°C bei einem Licht:Dunkel-Zyklus von 13:11 Stunden. Als Nahrung diente Trockenfutter und Lebendfutter (*Artemia salina*, *Daphnia*), das mehrmals täglich verabreicht wurde.

2.2 Lichtmikroskopie und Fotodokumentation

Die zytogenetische Auswertung der Präparate erfolgte an einem Photomikroskop III der Fa. Zeiss. Die für die Hellfeld-Aufnahmen verwendeten Filme waren entweder Agfa-Ortho 25 oder ORT 25 Macophot.

Lebende Fische wurden mit einer Minolta Digitalkamera RD-175 mit einem Minolta AF Makroobjektiv, 50 mm, 1:2.8 (32) aufgenommen und im Computer mit Adobe® Photoshop bearbeitet.

2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die für die verwendeten Agarosegele (0.8-2.0%) benötigte Menge an Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer (bzw. 1 x TAE) aufgenommen und im Mikrowellengerät geschmolzen. Nach Abkühlung unter 60°C konnte die Agarose in die vorbereiteten Gelkammern gegossen werden. Das erhärtete Gel wird in eine mit 1 x TBE (bzw. 1 x TAE) gefüllte Gelkammer eingesetzt, die Proben mit 1/10 Volumen 10 x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Zur Abschätzung der Fragmentgröße wird ein Längenstandard aufgetragen, der Fragmente bekannter Größe aufweist.

10 x TBE-Puffer: 900 mM Tris

900 mM Borsäure

10 mM EDTA,

pH 8.0

10 x TAE-Puffer: 400 mM Tris

400 mM Essigsäure

10 mM EDTA,

pH8.0

10 x Probenpuffer: 50% Glycerin

100 mM EDTA pH 8.0

1% SDS

0.25% Bromphenolblau

0.25% Xylencyanol

Genomische DNA wird bei ca. 3 V/cm aufgetrennt, durch Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA bei bis zu 5 V/cm. Anschließend wird das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) 20-40 min gefärbt und auf dem UV-Transilluminator (254 nm) photographiert. Zu klonierende DNA-Fragmente werden über langwelligem UV-Licht (366 nm) aus dem Gel ausgeschnitten, um UV-induzierte DNA-Strangbrüche zu vermeiden, und mit dem Concert Rapid Gel Extraction System von Quiagen aus dem Gel extrahiert.

3 Molekulare Charakterisierung der Mikrochromosomen

3.1 Einleitung

Unter Laborbedingungen werden *P. formosa* normalerweise mit Black Molly-Männchen als Spermiodonatoren gezüchtet. Black Molly ist eine Zuchtform der Gattung *Poecilia* (Abbildung 9), die wahrscheinlich aus einer Kreuzung zwischen *P. sphenops* und *P. latipinna* hervorging (Schröder, 1964).



Abbildung 9: *P. formosa*-Weibchen (oben) mit Black Molly-Männchen (unten).

Der Name Black Molly geht auf die Schwarzfärbung der gesamten Körperoberfläche und der Flossen zurück. Diese Pigmentierung wird durch einem besonderen Zelltyp, die sog. „Makromelanophoren“ (Schartl et al., 1997) verursacht. Während „Mikromelanophoren“ melaninhaltige Zellen normaler Zellgröße (30 – 100µm) darstellen, die für die wildtypisch graue Färbung von *P. formosa* verantwortlich sind, sind Makromelanophoren außergewöhnlich groß (300 – 500 µm; Abbildung 10).

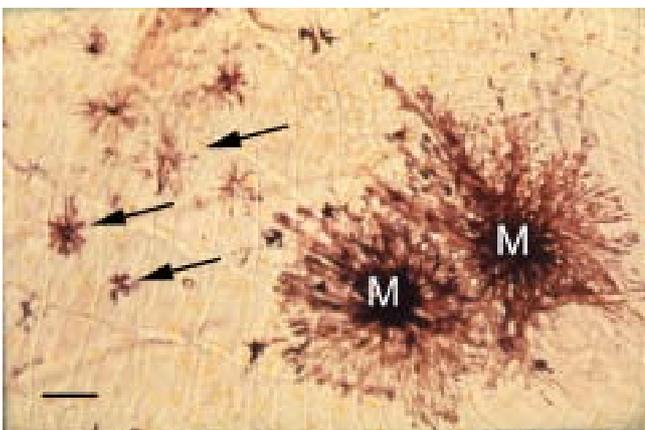


Abbildung 10: Pigmentzellen bei Poeciliiden. Mikromelanophoren (Pfeile) sowie Makromelanophoren (M). Der Balken entspricht 100 µm. Foto: M. Schartl.

Die Pigmentierung aufgrund von Makromelanophoren wird von dominanten Genen gesteuert, die bei Black Molly, jedoch nicht bei wildtypisch grau-grün gefärbten Fischen wie *P. formosa* und den Wildformen von *P. mexicana* und *P. latipinna* zu finden sind (Schröder, 1964).

3.1.1 Paternale Introgression in Form von Mikrochromosomen

Normalerweise sind die Nachkommen solcher mit Black Molly (Abbildung 11b) angepaarten *P. formosa* (Abbildung 11a) aufgrund der gynogenetischen Fortpflanzungsweise mit ihren Müttern genetisch identisch und daher ebenfalls wildtypisch gefärbt. In seltenen Fällen (ca. 1%) treten jedoch Nachkommen auf, die ein schwarzes Pigmentmuster aufweisen (Abbildung 11c).

Eine Untersuchung der Pigmentzellen ergab, daß es sich dabei um Makromelanophoren handelte (Schartl et al., 1995b). Allerdings unterschied sich das Pigmentmuster von den gleichmäßig gefleckten Individuen, die aus Kreuzungen zwischen Black Mollies und wildtypisch gefärbten sexuellen *Poecilia* hervorgingen (Abbildung 11d).

Nur zwei von ca. 50 in unseren Laboratorien (Würzburg, Hamburg) erhaltenen gefleckten Weibchen gaben die Pigmentierung an einen Teil ihrer Nachkommen weiter. Es wurden gefleckte und fast schwarze Individuen erhalten (Abbildung 11e, f, g). Daneben wurden auch rein wildtypisch gefärbte Nachkommen produziert.

Schon Balsano et al. (1989) fanden Nachzuchten von *P. formosa* mit Black Molly, die schwarze Flecken aufwiesen jedoch niemals ihre Pigmentierung an die Nachkommen weitergaben. Entgegen deren Vermutung stellte sich heraus, daß diese Individuen nicht triploid waren. Auch Schartl et al. (1995b) konnten anhand von DNA-Fingerprinting keine Unterschiede zwischen gefleckten oder fast komplett schwarzen *P. formosa*, ihren wildtypisch gefärbten Geschwistern und dem ursprünglichen maternalen Klon (*P.f.* I) finden. Die Beteiligung des paternalen Genoms mußte demnach sehr gering sein, was auch durch die Tatsache gestützt wurde, daß Gewebetransplantate gefleckter Individuen von ungefleckten Tieren nicht abgestoßen wurden (Schartl et al., 1995b).

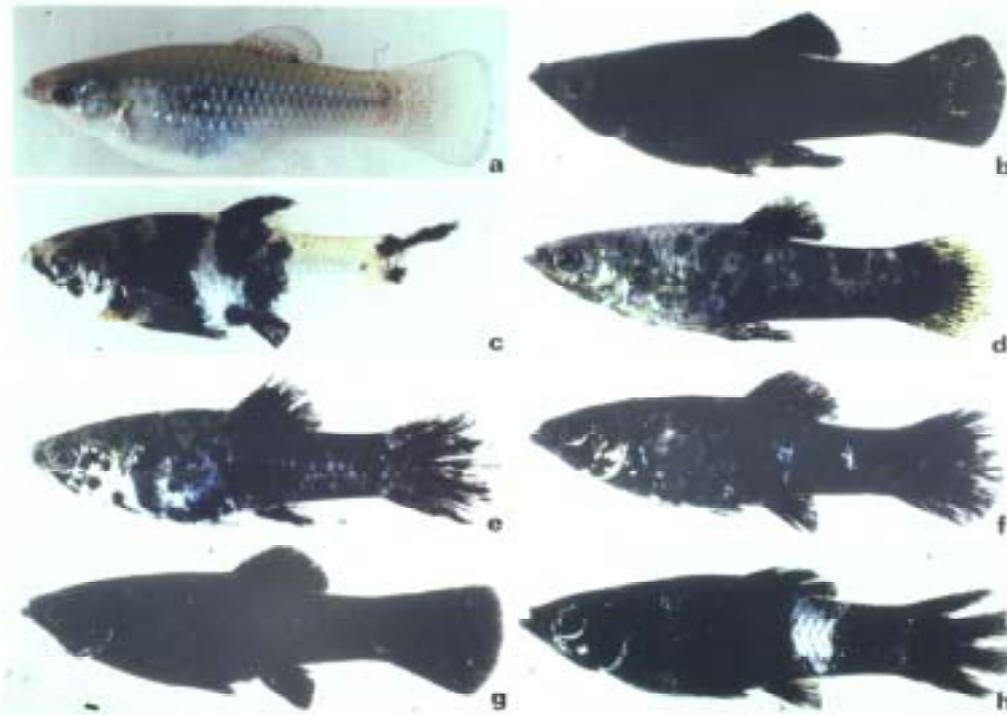
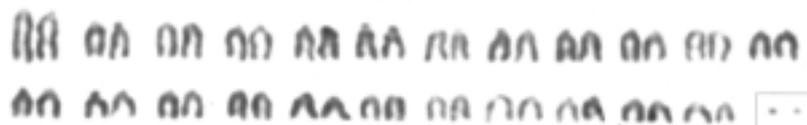


Abbildung 11: Darstellung ungewöhnlich pigmentierter *P. formosa*, die aus Zuchtansätzen mit Black Molly stammen. (a) Wildtypisch gefärbtes *P. formosa*-Weibchen; (b) Black Molly-Männchen; (c) ungewöhnlich pigmentiertes *P. formosa*-Weibchen aus Kreuzung zwischen (a) und (b); (d) als Vergleich dazu ein gleichmäßig pigmentiertes Hybridtier aus einer Kreuzung zwischen *P. mexicana* x Black Molly; (e) gefleckte Tochter von (c); (f), (g) gefleckte bzw. fast völlig schwarze Enkel von (c); (h) ein fast schwarzer Urenkel von (c), der eine große un pigmentierte Stelle aufweist. Aus Schartl et al., (1995b).

a



b

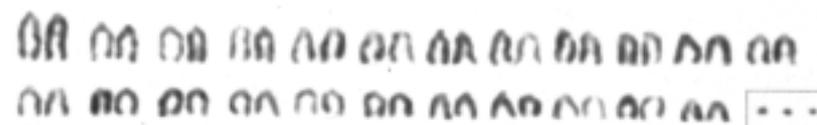


Abbildung 12: Karyogramm von pigmentierten *P. formosa* mit zwei (a) bzw. drei (b) Mikrochromosomen. Nach Schartl et al. (1995b).

Erst anhand von zytogenetischen Analysen konnte der väterliche Beitrag in Form sog. „Mikrochromosomen“ identifiziert werden (Abbildung 12). Mikrochromosomen sind kleine, überzählige Chromosomen, die bei allen untersuchten gefleckten *P. formosa* identifiziert werden konnten. Weder der ursprüngliche Wildtyp-Stamm *P.f.* I noch der Laborstamm von Black Molly wiesen Mikrochromosomen auf.

Der genaue Mechanismus, wie es bei einem gynogenetischen Organismus zu paternaler Introgression kommen kann, ist bislang nicht geklärt. Es wird angenommen, daß es sich dabei um einen Fehler des Mechanismus handelt, der bei gynogenetischer Fortpflanzungsweise für den Ausschluß bzw. Abbau des Spermien-genoms sorgt.

Es stellte sich heraus, daß die ungefleckten *P. formosa*-Nachkommen ein Mikrochromosom, gefleckte Individuen überwiegend zwei und die fast vollständig schwarz gefärbten Tiere überwiegend drei Mikrochromosomen zusätzlich zu dem diploiden Chromosomensatz aufwiesen. Demnach korreliert die Pigmentierung stark mit der Anwesenheit von zwei oder drei Mikrochromosomen. Die Gene, die für die Pigmentierung verantwortlich sind, der sogenannte Makromelanophoren-Locus, müssen deshalb auf diesen Mikrochromosomen liegen und werden vor dem genetischen Hintergrund eines fremden Organismus exprimiert. Dies stellt eine besondere Situation dar, da überzählige Chromosomen normalerweise genetisch inert sind (Jones & Rees, 1982).

Da ca. 30% der Nachkommen eines gefleckten Weibchens keine Pigmentierung aufweisen, scheinen die Mikrochromosomen nicht stabil vererbt zu werden. Dies gilt jedoch nur für das zweite und dritte Mikrochromosom, da bisher kein Individuum alle Mikrochromosomen verloren hatte (Schartl et al., 1995b; und unveröffentlichte Daten). Demnach wird eines der Mikrochromosomen zu einem festen Bestandteil des Genoms und stabil an alle Nachkommen weitervererbt, während das zweite und/oder dritte Mikrochromosom in der Keimbahn verloren gehen kann.

Interessanterweise entwickelten einige dieser Mikrochromosomen-Träger ausgehend von den Makromelanophoren bösartige Pigmentzelltumore (maligne Melanome) (Abbildung 13). Es wurde niemals beobachtet, daß wildtypische *P. formosa* oder Tiere, die die Mikrochromosomen mit dem Makromelanophoren-Locus verloren hatten, Tumore entwickelten. Auch Black Mollies zeigen trotz des hohen Anteils an Makromelanophoren keine Melanome (Schartl et al., 1997)



Abbildung 13: Malignes Melanom am Maul eines fast völlig schwarz gefärbten *P. formosa*. Nach Scharf et al. (1997).

Dies erinnert an die Situation bei *Xiphophorus* (*Poeciliidae*): Bereits in den 20er Jahren beschrieben Genetiker, daß die Nachkommen aus einer bestimmten Kreuzung zwischen dem makromelanophorentragenden Platy (*Xiphophorus maculatus*) und dem grünen Schwertträger (*Xiphophorus helleri*) eine Verstärkung der Pigmentierung bis hin zu bösartigen Wucherungen entwickelten (Gordon, 1927; Häussler, 1928; Kosswig, 1928). Diese als Melanome identifizierte Wucherungen gingen stets von den Pigmentflecken aus, die aus Makromelanophoren gebildet wurden.

3.1.2 Das *Xiphophorus*-Melanom-System

Durch die Kreuzung eines *X. maculatus*-Weibchen, das ein Makromelanophorenmuster in der Rückenflosse (Sd = „spotted dorsal“) aufweist, mit einem *X. helleri*-Männchen, das keine Makromelanophoren besitzt, resultieren Hybride, die bereits eine Verstärkung des Pigmentmusters in der Rückenflosse zeigen. Da es bislang keine vergleichende Klassifikation von Pigmentzellläsionen bei Fischen und Säugetieren gibt, wird diese Verstärkung des Makromelanophorenusters aufgrund von histologischen Kriterien als benignes Melanom bezeichnet. Werden diese Hybride mit *X. helleri* rückgekreuzt, kommt es in den Nachkommen zu einer Aufspaltung: 50 % der Nachkommen haben keine Makromelanophoren; 25 % zeigen ein verstärktes Pigmentmuster, das entsprechend dem der F₁-Generation als benignes Melanom zu charakterisieren ist (Vielkind et al., 1977), und 25 % zeigen ein malignes Melanom, das invasiv in umliegendes Gewebe einwächst.

Histologische Untersuchungen der Tumore belegen, daß die Malignität mit dem Differenzierungsgrad der Pigmentzellen korreliert: Gutartige Melanome bestehen überwiegend aus ausdifferenzierten Melanophoren, während bösartige Melanome

vor allem aus gering differenzierten, proliferierenden Melanoblasten und Melanozyten zusammengesetzt sind (Anders et al., 1984).

Nach Ahuja & Anders (1976) ist ein auf dem Geschlechtschromosom von *X. maculatus* befindlicher Tumorlocus (*Tu*) für die Melanomentstehung verantwortlich. In Wildtyp-Fischen unterliegt dieser Tumorlocus der Kontrolle eines autosomalen regulatorischen Locus *R*, der die Aktivität von *Tu* im Sinne eines Tumorsuppressors unterdrückt. Erst durch die sukzessive Eliminierung dieses Regulators durch Kreuzung mit *X. helleri*, der weder *Tu* noch *R* enthält, kommt es durch die Aktivität des Tumorlocus zur Tumorentstehung. Die Kreuzungsdaten lassen jedoch noch eine alternative Interpretation zu. *R* könnte auch eine Rolle als Aktivator einnehmen, der aus dem *X. helleri*-Genom in die Hybriden eingeführt wird. Auch bei diesem alternativen genetischen Modell kommt es zu einer Gendosis-abhängigen Aktivierung von *Tu*.

Bei der für die Tumorentstehung verantwortlichen Komponente des *Tu*-Locus handelt es sich um eine Rezeptortyrosinkinase vom Typ I (Ullrich & Schlessinger, 1990), die große Ähnlichkeit mit dem humanen EGF-Rezeptor aufweist, jedoch nicht das korrespondierende Fisch-Homolog darstellt. Deshalb wurde das Gen als *Xiphophorus* Melanom Rezeptor Kinase bezeichnet (*Xmrk*).

Neben einer onkogenen Kopie von *Xmrk* konnte eine weitere Genkopie detektiert werden, die unabhängig von der Anwesenheit des *Tu*-Locus in allen untersuchten Fischen dieser Familie zu finden ist (Schartl, 1990). Durch Identifizierung eines Genlocus, der die gleiche Sequenz wie die 5'-Region des Onkogens enthält (*D*-Locus, Adam et al., 1993), ließ sich ein Modell für die Entstehung des *Xmrk*-Onkogens erstellen: Durch eine nicht-homologe Rekombination zwischen dem Protoonkogen und dem *D*-Locus entstand eine zweite Kopie von *Xmrk*, die unter die Kontrolle des fremden Promotors gelangte und dadurch überexprimiert wird (für einen Überblick siehe Gutbrod & Schartl, 1999; Schartl, 1995).

3.1.3 Mikrochromosomen als Ursache für Pigmentzelltumore

Obwohl die Situation in Bezug auf das Vorhandensein eines Makromelanophoren-Locus in einem fremden genetischen Hintergrund mit dem *Xiphophorus*-System vergleichbar ist, gibt es doch einige Besonderheiten bei dem *P. formosa*-System:

- Obwohl alle Fische klonal sind, entwickeln nur etwa 5 % Tumoren.
- Trotz der gleichmäßigen Pigmentierung des Körpers und der Flossen war die Entstehungsorte der Tumoren nicht zufällig verteilt. Sie traten nur am vorderen Körperende auf und waren dort signifikant häufiger am linken Kiemendeckel, am oberen Rand der Schnauze und am Schädeldach zu lokalisieren. Nie waren Tumore im hinteren Körperabschnitt zu finden.
- Bei *P. formosa* variierte stark das Alter, in dem die Fische den Tumor ausbildeten. Das früheste Auftreten eines Tumors wurde bei einem 3 Monate alten Tier beobachtet, andere Individuen bildeten erst in einem Alter von über einem Jahr einen Tumor aus (Schartl et al., 1997).
- Die Wachstumsraten der Tumore zeigten ebenfalls eine starke Streuung. Während einige Melanome innerhalb von zwei bis drei Wochen ein bestimmtes Volumen erreichten, benötigten andere dazu bis zu vier Monate (Schartl et al., 1997).

Diese Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede zu dem *Xiphophorus*-Melanom-System, bei dem Fische eines bestimmten Genotyps eine Tumorraten von 100 % zeigen. Ebenso entstehen die Tumore immer an der gleichen Stelle und zeigen eine vergleichbare Malignität. Trotz dieser Unterschiede zwischen dem *Xiphophorus*-Melanom-System und dem *P. formosa*-Melanom-System wurde überprüft, ob *Xmrk* auch bei *P. formosa* eine tumorauslösende Funktion zukommt. Durch Hybridisierung von *Xmrk*-cDNA auf genomische DNA von gefleckten und wildtypisch gefärbten *P. formosa* konnten in Southern Blot-Experimenten keine Unterschiede nachgewiesen werden, die wie im *Xiphophorus*-System auf eine zweite onkogene Kopie von *Xmrk* in Melanomfischen hinweisen würden. Ebenso konnte auf Proteinebene mit einem *Xmrk*-spezifischen Antikörper keine Überexpression des Rezeptors detektiert werden. Auch andere Protoonkogene, z.B. aus der *src*-Familie (*c-src*, *c-yes*), die in *Xiphophorus*-Melanomen normalerweise überexprimiert werden, zeigten keine erhöhten Transkriptmengen in Tumorgewebe von *P. formosa*.

Demnach scheinen die Mikrochromosomen einen bislang nicht identifizierten Genlocus zu tragen, der in Anwesenheit des Makromelanophoren-Locus die Voraussetzungen für die Entwicklung eines Pigmentzelltumor schafft. Obwohl die Tumore bei *P. formosa* und *Xiphophorus* in ihrer histologischen Erscheinungsform sehr ähnlich sind, scheinen doch unterschiedliche molekulare Ursachen für deren Entstehung verantwortlich zu sein.

3.1.4 *P. formosa* als Modellsystem

Trotz des gewaltigen Fortschritts, den die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung einzelner Tumorgene brachte, ist man von einem Verständnis der Vorgänge, die zum Tumor führen, noch weit entfernt. Die Hauptschwierigkeit in der Analyse der extrem komplexen Situation liegt darin, aus dem Endprodukt Tumor auf die Abfolge der Ereignisse zu schließen bzw. die erste genetische Aberration zu identifizieren. Genetische Modellsysteme (wie z.B. das *Xiphophorus*-Melanom-System) haben den Vorteil, daß die Gene, die für die primären Ereignisse der Tumorentstehung verantwortlich sind, durch klassische genetische Methoden eindeutig definiert sind. Auch durch gezielte Kreuzungen können die auslösenden Faktoren weiter eingegrenzt werden. In diesem Sinne könnte *P. formosa* ein weiteres Modellsystem zur Tumorforschung darstellen, da das Auftreten maligner Melanome eindeutig mit dem Vorhandensein von Mikrochromosomen korreliert, die den Makromelanophoren-Locus von Black Molly tragen. Damit kann die Ursache bereits auf einen Bruchteil (ca. 1/20) des Genoms eingegrenzt werden.

3.1.5 Fragestellung

Mit der Charakterisierung dieser Mikrochromosomen kann demnach ein großer Schritt zur Aufklärung der komplexen Vorgänge geleistet werden, die zur Tumorbildung bei *P. formosa* führen. Zusätzlich kann die Frage nach der Bedeutung der paternale Introgression für die Evolution von *P. formosa* nur angegangen werden, wenn bekannt ist, ob und welche funktionellen Gene sich auf den Mikrochromosomen befinden.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst eine Methode etabliert werden, mit der es möglich ist, die Mikrochromosomen zu isolieren. Dazu wurden verschiedene Methoden angewandt, die entweder die Isolierung ganzer Mikrochromosomen (Mikrosezierung, Pulsfeld-Gelelektrophorese, Chromosomen-Sortierung) oder mikrochromosomaler Sequenzen zum Ziel hatten (Multilocus DNA-Fingerprinting, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)).

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Fische

Zur Analyse wurden verschiedene Laborstämme von Mikrochromosomen-Trägern (*P.f.* 637, *P.f.* 533, *P.f.* 857) untersucht. Diese Laborstämme stammen von einem einzigen Tier von *P.f.* I ab, das ursprünglich 1989 die Mikrochromosomen von Black Molly erworben hatte. Bei *P.f.* I handelt es sich um einen Laborstamm, der auf Tiere zurückgeht, die ca. 1953 von CP Haskins bei Brownsville (Tx, USA) gesammelt worden waren. Die verschiedenen Mikrochromosomen-Stämme sind nacheinander durch Abspaltung und Isolation von Klonen aus der Ursprungslinie entstanden. *P.f.* 533 ist seit August 1992, *P.f.* 637 seit Februar 1994 und *P.f.* 857 seit November 1995 isoliert gezüchtet worden.

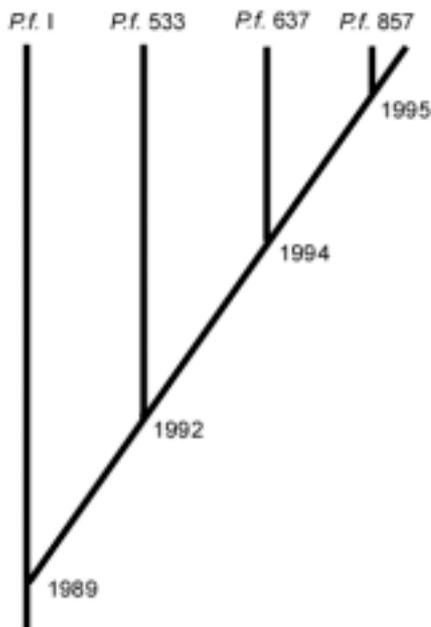


Abbildung 14: Schematische Darstellung der einzelnen Mikrochromosomen-tragenden Stämme von *P. formosa*. Der Stammbaum beruht auf zwei Tieren aus dem Wildtyp-Stamm *P.f.* I, die Mikrochromosomen von Black Molly erhalten hatten und diese an die Nachkommen weitergaben.

3.2.2 Multilocus DNA-Fingerprint

DNA-Fingerprints wurden angefertigt wie unter 4.2.6 beschrieben.

Struktur der +3-Primer:

EcoRI-Primer: 5'-GACTGCGTACCAATTC NNN-3'

MseI-Primer: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA NNN-3'

Zunächst werden je 500 ng genomische DNA von Mikrochromosomen-tragenden Individuen sowie von Wildtyp-Stamm *P.f. I* mit je 5U *EcoRI* und *MseI* für 1 h in 40 µl 10 mM Tris-HAc pH 7.5, 10 mM MgAc₂, 50 mM KAc, 5 mM DTT und 50 ng/µl BSA gespalten. Anschließend wird in 10 µl desselben Puffers unter Zugabe von 1 mM ATP, 1 U T4 DNA Ligase, 5 pMol *EcoRI*-Adapter und 50 pMol *MseI*-Adapter für 3 h bei 37°C ligiert. 5 µl der mit 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0 im Verhältnis 1:10 verdünnten Ligation werden als Matrize in der folgenden Erstamplifizierung eingesetzt. Diese erfolgt in 1 x PCR-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 8.85, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100) mit je 30 ng der beiden +1-Primer (*EcoRI*+A, *MseI*+G), 200 µM der vier Nukleotide und 0.4 U Taq Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl.

Erstamplifizierung:	94°C	120 sec	1 Zyklus
	<hr/>		
	94°C	30 sec	
	56°C	60 sec	20 Zyklen
	72°C	60 sec	
<hr/>			
	72°C	120 sec	1 Zyklus

Nach erneuter 1:10 Verdünnung werden 5 µl als Matrize in die zweite PCR in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Dabei werde 30 ng des einen +3-Primers eingesetzt und 5 ng des anderen +3-Primers, der radioaktiv markiert wird.

Die radioaktive Markierung des Primers erfolgt in 1 x Kinasepuffer in einem Volumen von 50 µl unter Verwendung von 500 ng Primer, 100 µCi [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP und 10 U T4 Polynukleotidkinase für 30 min bei 37°C. Die Reaktionsprodukte werden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Als *EcoRI*+3-Primer wurden ACC und AAC verwendet, als *MseI*+3-Primer GTG, GAG, GGT, GTC, GCA, GAA, GCC und GAT.

Zweitamplifizierung:	94°C	120 sec	1 Zyklus
	94°C	30 sec	12 Zyklen
	65°C	30 sec	
	72°C	60 sec	1 Zyklus

In den ersten 12 Zyklen wird die Annealing-Temperatur um 0.7°C pro Zyklus reduziert, woran sich weitere 24 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 56°C anschließen:

94°C	120 sec	1 Zyklus
94°C	30 sec	24 Zyklen
56°C	30 sec	
72°C	120 sec	1 Zyklus

Die Amplifizierungen erfolgten im Thermal Controller PTC-100 (MJ Research, Inc., Massachusetts, USA). Die PCR-Proben werden 1:1 mit Ladepuffer verdünnt und bis zum Gellauf bei -20°C gelagert.

Ladepuffer: 98% Formamid
10 mM EDTA pH 8.0
0.05% Bromphenolblau
0.05% Xylencyanol

Denaturierende Polyacrylamid-Gele

Die durch AFLP erhaltenen PCR-Produkte werden 5 min hitzedenaturiert, auf ein 5% denaturierendes Gel (40 x 30 cm) aufgetragen und ca. 2 h bei 35 W aufgetrennt.

Gellösung: 5% Acrylamid / Bisacrylamid (19:1)
 0.5 x TBE
 0.024% TEMED
 0.1% APS
 7 M Harnstoff

Anschließend wird das Gel unter Vakuum getrocknet und ein Röntgenfilm bei Raumtemperatur zur Erstellung einer Autoradiographie aufgelegt.

Klonierung von PCR-Fragmenten

Durch Auflegen des Films auf das getrocknete Gel werden die Banden von Interesse markiert und ausgeschnitten. Etwa ein Drittel des Gelstücks wird direkt in einem Reaktionsansatz von 50 µl entsprechend der Erstamplifikation reamplifiziert.

Reamplifizierung:	94°C	120 sec	1 Zyklus
	94°C	30 sec	40 Zyklen
	56°C	30 sec	
	72°C	120 sec	1 Zyklus

Die PCR-Produkte wurden auf 1.5% Agarosegelen / 1 x TBE kontrolliert und aus 0.8% Agarosegelen / 1 x TAE ausgeschnitten und mit QUIAEX II (Quiagen) aufgereinigt. Mit Hilfe des SureClone™ Ligaton Kits (Pharmacia) wurden die PCR-Produkte gemäß den Anweisungen des Herstellers in den Vektor pUC18 kloniert. Dabei werden im gleichen Reaktionsschritt 3'-Überhänge durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der Klenow Polymerase entfernt, sowie die 5'-Enden der Fragmente durch die T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert. Nach einer Phenol / Chloroform-Extraktion wird die wäßrige Phase über eine MicroSpin Säule gereinigt. Ein Teil davon wurde in äquimolaren Mengen mit dem *Sma*I geschnittenen, dephosphorylierten Vektor in die Ligationsreaktion eingesetzt. Die Ligation erfolgte in 1 x Ligasepuffer mit 1 U T4 DNA-Ligase in einem Volumen von 20 µl für 2-4 h bei 16°C.

Herstellung transformations-kompetenter Bakterien (nach Hanahan, 1985)

50 ml SOB-Medium werden mit 2 ml einer Bakterien-Vorkultur (*E. coli* XL-1 Blue) angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0.4 – 0.7 bei 550 nm Wellenlänge kultiviert. Die Bakteriensuspension wird auf Eis abgekühlt und bei 3000rpm (Minifuge RF, Heraeus) für 10 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden vorsichtig in eiskaltem TFB-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Hierauf werden die Bakterienzellen in einer adäquaten Menge an TFB-Puffer aufgenommen ($OD_{600} \times 6$ ml) und für 15 min auf Eis gekühlt. Nach zweimaliger Zugabe von 35 µl DnD pro ml Medium verbleiben die Bakterienzellen jeweils weitere 15 min auf Eis. Danach können die Transformations-kompetenten Bakterien bis zu 24 h auf Eis gelagert werden.

SOB-Medium:	20 g/l Trypton	DnD:	1 M DTT
	5 g/l Hefe-Extrakt		90% DMSO
	2.5 mM KCl		10 mM KAc, pH 7.5
	10 mM NaCl		
	pH 7.6 mit KOH		

TFB-Puffer: 100 mM KCl
45 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
10 mM $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
3 mM Hexamin-Co(III)Chlorid
10 mM MES (pH 6.3 mit KOH)
pH 6.2

Transformation kompetenter Bakterien

200 µl der Transformations-kompetenten Bakterienzellen wird je die Hälfte des Ligationsansatzes steril zugesetzt. Nach weiteren 15 min auf Eis werden die Bakterien für 90 sec einem Hitzeschock im 42°C Wasserbad ausgesetzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Die Suspension wird mit 1.3 ml SOB aufgefüllt und im Thermoblock bei 37°C unter mäßigem Schütteln 1 h inkubiert. Im Anschluß werden die transformierten Bakterienzellen 5 min bei 5000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) gesammelt, in 100 µl SOB-Medium resuspendiert und in verdünnter (10%) bzw.

konzentrierter (90%) Form auf LB^{Amp}-Platten ausgestrichen und über Nacht (o/n) kultiviert.

Platten-Agar: SOB-Medium
 15 g/l Agar
 20 mM MgSO₄

Auf jede Platte werden vor dem Ausplattieren der Bakterien 50 µl X-Gal (20 mg/ml) und 50 µl IPTG (20 mg/ml) aufgebracht.

Präparation der Plasmid-DNA aus kompetenten Bakterien (nach Del Sal et al., 1988)

1.5 ml einer o/n Bakterienkultur werden 5 min bei 5000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert, und das Pellet in 200 µl STET-Puffer gründlich resuspendiert. Nach Zugabe von je 4 µl Lysozymbilösung (50 mg/ml) werden die Proben 5 min bei RT inkubiert und anschließend 45 sec in kochendes Wasser gestellt. Die Bakterienbestandteile (Membranbruchstücke und anhaftende chromosomale DNA) werden abzentrifugiert (10 min, 10 000 rpm) und mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Zum Abtrennen von Proteinen von der Plasmid-DNA werden dem Überstand 8 µl einer 5% CTAB-Lösung zugegeben und 5 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 300 µl NaCl (1.2 mM) gelöst, die Plasmid-DNA mit 2.5 Vol 100% Ethanol gefällt und nach 15 minütiger Inkubation bei -20°C abzentrifugiert (10 min bei 10000 rpm, 4°C, Eppendorf Tischzentrifuge). Nach Waschen mit 70% Ethanol wird die DNA in 40 µl H₂O gelöst.

STET-Puffer: 8% Saccharose
 0.5% Triton X-100
 50 mM Tris-Cl pH 8.0
 50 mM EDTA pH 8.0

Zum Herausschneiden des klonierten Fragments wurde ein Doppel-Restriktionsenzym-Verdau (*EcoRI*, *BamHI*) bei gleichzeitiger Anwesenheit von

2.5µg RNase A in einem Reaktionsvolumen von 20 µl vorgenommen, und das Ergebnis auf einem 1.5% Agarosegel überprüft.

Bakterien, die ein Plasmid mit dem richtigen Fragment tragen, werden in 30 ml SOB-Medium vermehrt, und die Plasmid-DNA mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen) laut Protokoll des Herstellers präpariert. Diese wurde dann sowohl für die Sequenzierung als auch als Sonde für die in-situ-Hybridisierung verwendet.

Anlegen von Bakterien-Dauerkulturen

Zur Lagerung rekombinanter Bakterien bei -80°C werden 1 ml einer Übernachtskultur 250 µl 86% Glycerin zugesetzt, durch Vortexen gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Sequenzierung von PCR-Produkten

Die durch Klonierung erhaltenen AFLP-Fragmente wurden mit dem Cycle Sequencing Kit (RPN, Pharmacia) gemäß den Anweisungen des Herstellers auf dem ALF™ DNA Sequencer AM V3.0 (Pharmacia) sequenziert.

3.2.4 Southern Blot-Analyse

Bei der Southern Blot-Analyse wird mit Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran übertragen. Auf dieser können durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde komplementäre Sequenzen detektiert werden.

Restriktionsenzymverdau genomischer DNA

Zur Southern Blot-Analyse werden 8-10 µg genomische DNA mit 10 U/µg eines Restriktionsenzym über Nacht verdaut und auf einem 0.8% Agarosegel in 1 x TAE-Puffer ca. 17 Stunden bei 1.5 V / cm aufgetrennt.

Alkalischer Transfer von DNA auf eine Nylonmembran

Der Transfer der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran erfolgt durch Kapillarkräfte (modifiziert nach Southern, 1975).

Nach der Fotodokumentation des Ethidiumbromid gefärbten Gels über UV-Licht wird das Gel für 2 x 15 min in 0.25 M HCl geschwenkt. Dies ermöglicht einen effizienten DNA-Transfer auf die Membran. Die Denaturierung der DNA im Gel erfolgt durch 2 x 15 minütiges Schwenken in 1.5 M NaCl / 0.5 M NaOH. Zwei Lagen feuchten Whatman-Papiers, das mit beiden Enden in ein Reservoir mit 0.4 M NaOH hängt, dient zum Ansaugen der Transferlösung. Darauf wird luftblasenfrei das Gel gelegt. Die auf Gelgröße zurechtgeschnittene und mit Transferlösung angefeuchtete Nylonmembran wird luftblasenfrei auf dem Gel plaziert und mit einem feuchten und mehreren Lagen trockenem Whatman-Papier bedeckt. Den Abschluß bildet ein Stapel saugfähigen Papiers, welches mit einer Glasplatte beschwert wird. Der alkalische DNA-Transfer erfolgt für 4 bis 6 Stunden. Bevor man Membran und Gel trennt, werden die Geltaschen mit einem Bleistift auf dem Filter markiert. Die Membran wird anschließend kurz in 2 x SSC geschwenkt und leicht feucht mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (150 mJ im GS Gene Linker[®], BioRad) bestrahlt. Dadurch bindet sich die DNA fester an die Nylonmembran.

Radioaktive Markierung eines DNA-Fragments

Die radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde erfolgt nach Feinberg & Vogelstein (1983) mit einer Mischung aus Hexanukleotiden, die sich an die denaturierte DNA anlagern. Die Lücken zwischen den Hexanukleotiden werden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I unter Einbau von [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP aufgefüllt.

100 ng der DNA-Probe in einem Volumen von 33 μl werden im Wasserbad für 10 min bei 95°C denaturiert und nach Zugabe von 10 μl OLB-Mix eine weitere Minute denaturiert. Nach Abkühlung im Eis werden dem Ansatz 3 μl BSA (5mg/ml), 3 μl (30 μCi) [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP und 2 U Klenow-Polymerase hinzugefügt. Nach 3-stündiger Inkubation bei 37°C werden 100 μl Hybridisierungslösung zugegeben und weitere 10 min bei 95°C denaturiert.

OLB-Mix (Lösung A : Lösung B : Lösung C = 2 : 5 : 3):

Lösung A:	1 ml	1.25 M Tris-Cl, pH 8.0 / 0.125 M MgCl ₂
	18 µl	β-Mercaptoethanol
	je 5 µl	dATP, dGTP, dTTP (je 0.1 M in TE, GibcoBRL)
Lösung B:	2M	Hepes, pH 6.6
Lösung C:	OD ₂₆₀ 90/ml	Hexanukleotide in TE (Pharmacia)

Hybridisierung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nylonmembran wird diese zunächst mit 5 ml Hybridisierungslösung, die denaturierte Kalbsthymus-DNA (100 µg/ml) enthält, bei 42°C über Nacht unter Rotation des Gefäßes vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 42°C mit 4-5 ml Hybridisierungsmix, dem die hitzedenaturierte radioaktive Sonde beigefügt wurde.

Anschließend wird die Membran kurz in 2 x SSC gespült und 20 min mit 2 x SSC / 1 % SDS gewaschen. Danach wird die Membran stringent mit 1 x SSC / 1% SDS bei 63°C gewaschen und anschließend zum Entfernen von SDS kurz in 2 x SSC geschwenkt. Die Exposition erfolgt unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei – 80°C.

Hybridisierungsmix:	50 %	deionisiertes Formamid
	5 x	Denhardt's
	5 x	SSC
	1 %	SDS
	50 mM	Tris-Cl, pH 7.5
	0.1 %	Na-Pyrophosphat

3.3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte eine geeignete Methode gefunden werden, um die Mikrochromosomen von *P. formosa* isolieren und molekulargenetisch charakterisieren zu können. Dazu mußten sich bei der angewandten Methode Unterschiede zwischen Mikrochromosomen-Trägern und wildtypischen *P. formosa* auflösen lassen.

3.3.1 Multilocus DNA-Fingerprint Untersuchungen zum Nachweis paternaler Introgression

Im Multilocus DNA-Fingerprint konnten keine Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen von Mikrochromosomen-Trägern (*P.f.* 637, *P.f.* 533, *P.f.* 857) und dem Stamm (*P.f.* I) festgestellt werden, der ursprünglich 1989 die Mikrochromosomen von Black Molly erworben hatte (Abbildung 15). Dies bestätigt die Daten von Scharlt et al. (1995b).

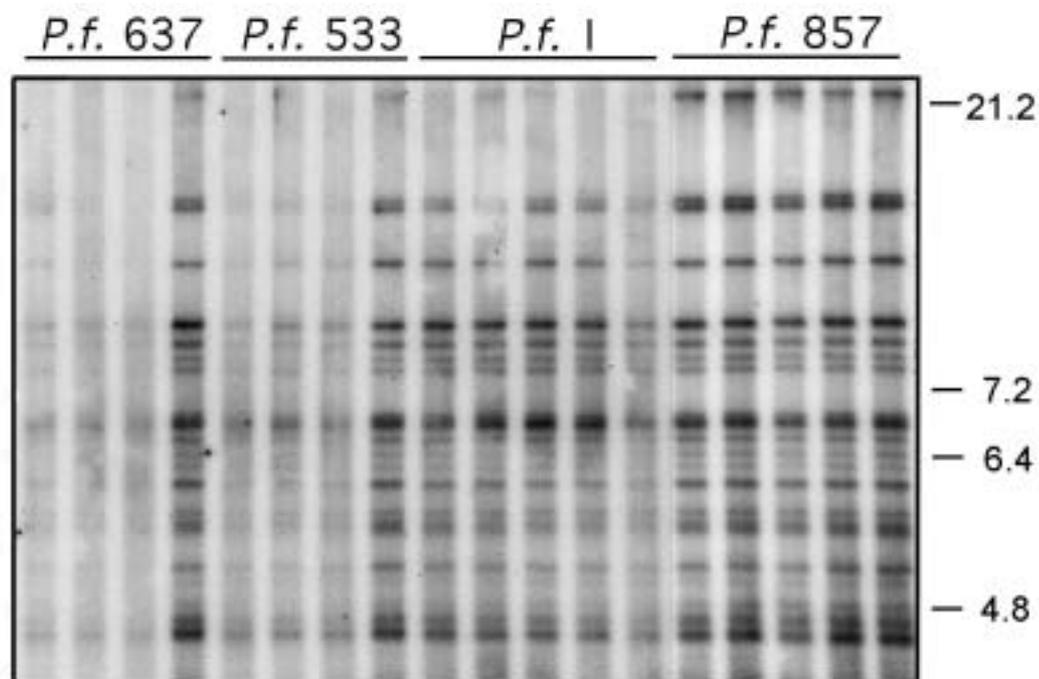


Abbildung 15: Multilocus DNA-Fingerprint hybridisiert mit dem Oligonukleotid $(GGAT)_8$ von einem Laborstamm von *P. formosa* (*P.f.* I), der durch paternale Introgression Mikrochromosomen von Black Molly erhalten hat und z.T. stabil weitervererbt.

Da die Auflösung der Methode bei ca. 5% liegt, muß das Material, welches durch paternale Introgression beigesteuert wurde, bei einer geschätzten Größe des *P. formosa*-Genoms von 1875 Mb weniger als 100 Mb betragen (Schartl et al., 1995b). Aus der karyologischen Untersuchung geht hervor, daß die Mikrochromosomen etwa einem Zehntel des kleinsten A-Chromosoms entsprechen. Über die 46 Chromosomen gemittelt wären das 40.7 Mb pro Chromosom. Ein Mikrochromosom hätte demnach rein rechnerisch ca. 4.7 Mb und kann tatsächlich im Multilocus DNA-Fingerprint nicht aufgelöst werden.

Mit dieser Methode konnten auch keine Mutationen zwischen den Mikrochromosomen-Trägern detektiert werden, die seit bis zu 11 Jahren isoliert gezüchtet wurden. Bei einer angenommenen Mutationsrate von 1.8×10^{-8} pro bp pro Jahr (Schartl et al., 1991) liegt die Anzahl theoretisch angefallener Mutationen ebenfalls unter dieser Auflösungsgrenze.

3.3.2 AFLP

Mit drei der 16 verwendeten Primerkombinationen konnten Unterschiede zwischen den Mikrochromosomen-Trägern und dem ursprünglichen Wildtyp *P.f. I* aufgezeigt werden.

Mit der Primerkombination Eco+AAC / Mse+GAA in der zweiten PCR konnten neben ansonsten identischen Banden eine Bande erhalten werden, die bei Mikrochromosomen-Trägern etwas stärker ausgeprägt war als bei dem Wildtyp-Stamm *P.f. I* (Abbildung 16).

Mit den Primern Eco+AAC / Mse+GCC wurde ebenfalls eine Bande detektiert, die in ihrer Intensität bei dem Wildtyp-Stamm *P.f. I* geringer ist als bei den Mikrochromosomen-Trägern (Abbildung 17). Ob es sich dabei um eine einzige polymorphe Bande handelt oder um zwei verschiedene PCR-Produkte, die in ihrer Länge identisch sind, ist unklar.

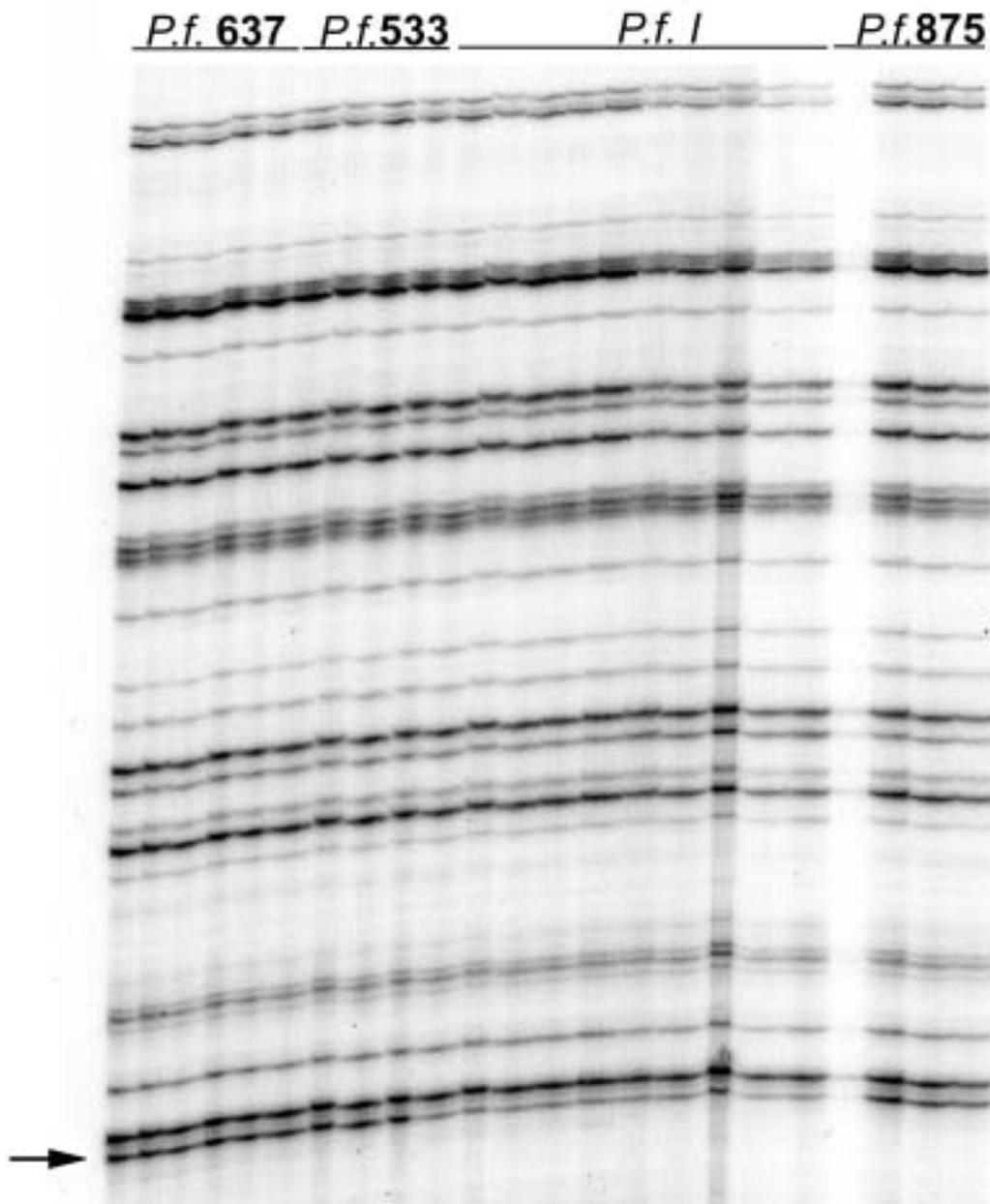


Abbildung 16: AFLP-Analyse von Mikrochromosomen-Trägern (*P.f. 637*, *P.f. 533* und *P.f. 875*) und dem ursprünglichen Wildtyp-Stamm *P.f. I* mit der Primerkombination Eco+AAC / Mse+GAA. Neben dem sonst identischen Bandenmuster weist die durch den Pfeil gekennzeichnete Bande in dem Wildtyp-Stamm *P.f. I* eine geringere Intensität auf.

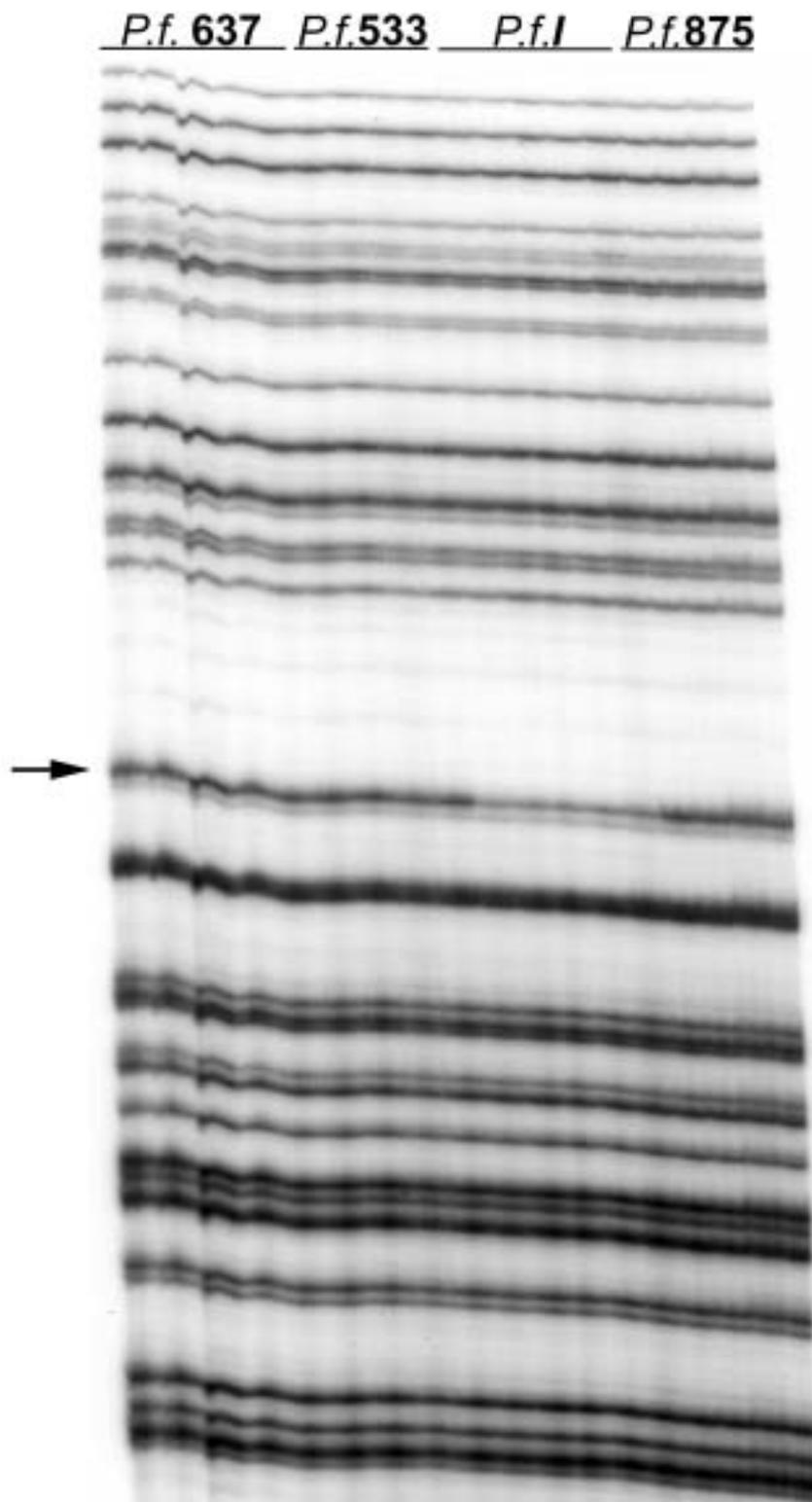


Abbildung 17: AFLP-Analyse von Mikrochromosomen-Trägern (*P.f. 637*, *P.f. 533* und *P.f. 875*) und dem ursprünglichen Wildtyp-Stamm *P.f. I* mit der Primerkombination Eco+AAC / Mse+GCC. Neben dem sonst identischen Bandenmuster weist die durch den Pfeil gekennzeichnete Bande in dem Wildtyp-Stamm *P.f. I* eine geringere Intensität auf.

Bei der Primerkombination Eco+AAC / Mse+GCA konnte neben dem sonst identischen Bandenmuster eine Bande detektiert werden, die ausschließlich bei Mikrochromosomen-Trägern zu finden war. Sie fehlte immer bei Tieren des Wildtyp-Stamms *P.f. I* (Abbildung 18).

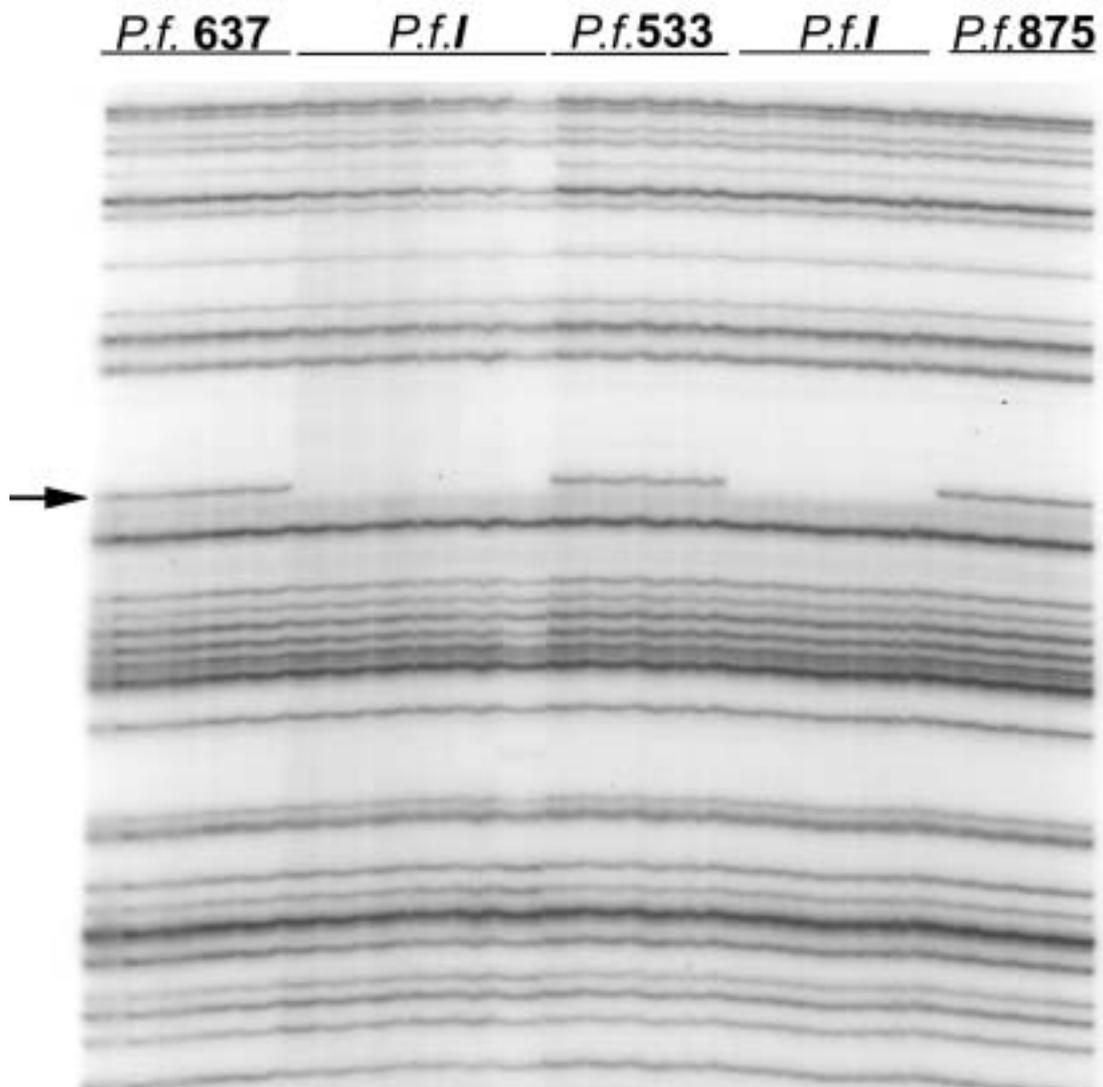


Abbildung 18: AFLP-Analyse von Mikrochromosomen-Trägern (*P.f. 637*, *P.f. 533* und *P.f. 875*) und dem ursprünglichen Wildtyp-Stamm *P.f. I* mit der Primerkombination Eco+AAC / Mse+GCA. Neben dem sonst identischen Bandenmuster fehlt die durch den Pfeil gekennzeichnete Bande in dem Wildtyp-Stamm *P.f. I* gänzlich, während sie bei den Mikrochromosomen-Trägern deutlich ausgeprägt ist.

Aufgrund der völligen Abwesenheit dieses PCR-Produktes bei P.f. I wurde die Bande bei den Mikrochromosomen-Trägern ausgeschnitten, kloniert und sequenziert.

Sequenz

Die mikrochromosomale Sequenz war inklusive der beiden +3-Primer (CAA und GCA) 259 bp lang (Abbildung 19). In keiner der über Internet verfügbaren Datenbanken konnte eine dazu homologe Sequenz gefunden werden.

1	GACTGCGTAC	CAATT<u>CAA</u>CA	AATGAGACAC	AACGTTTTCT	GAAGTGAGAG
51	AGCTCAGATG	GAGCCAGCTG	CAGACTGTCC	GGGAAAAAAAA	AGAAAGAAAA
101	AAAATAAGAC	TTCTTCTTTT	TGTGTAGTTA	CATATAGAGT	ACTGCAGCAC
151	ATTTATTATC	AACATATTTG	TTTGGTACCT	GTTAGCTGGT	TCTCTCTCTC
201	TCTTCCAGAT	ACGTTAGTCA	CAAATGGGAT	TTGCAAAACC	<u>TGCTTACTCA</u>
251	GGACTCATC				

Abbildung 19: Basenabfolge der Mikrochromosomen-spezifischen Sequenz. Die Primer sind fett gedruckt, die selektiven Nukleotide zusätzlich noch unterstrichen.

Southern Blot-Analyse

Um zu verifizieren, daß es sich bei der obengenannten Sequenz um eine rein mikrochromosomale Sequenz handelt, wurde eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. Dabei konnte bei allen getesteten Individuen ein Hybridisierungssignal auf der Höhe von etwa 14 kb nachgewiesen werden. Die höhere Intensität des Signals bei Black Molly beruht darauf, daß eine deutlich größere Menge an DNA auf das Gel aufgetragen worden war. Ein weiteres Signal bei etwa 13 kb zeigten nur Individuen mit Mikrochromosomen (Abbildung 20). Weder bei den beiden Tieren von P.f. I noch bei dem Black Molly-Männchen konnte diese Bande detektiert werden.

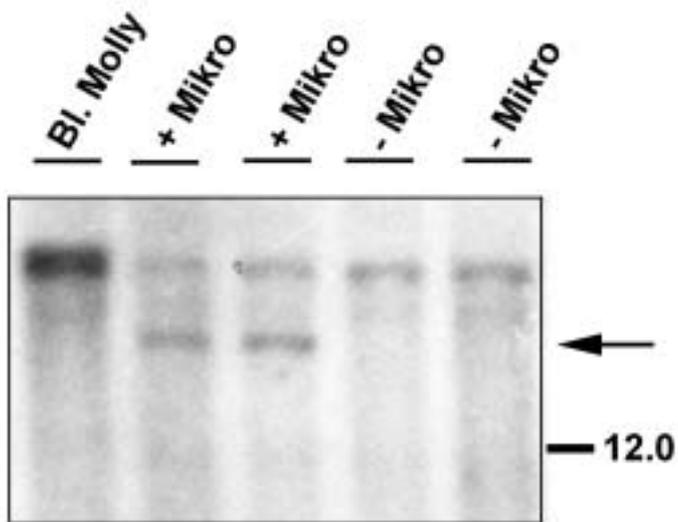


Abbildung 20: Southern Blot-Hybridisierung der mikrochromosomalen Sequenz auf *EcoRI*-gespaltene genomische DNA von einem Black Molly-Männchen, zwei gefleckten *P. formosa*-Weibchen mit Mikrochromosomen, sowie zwei wildtypischen *P. formosa*-Weibchen ohne überzählige Chromosomen.

3.4 Diskussion

Da die moderne Krebsforschung von der Möglichkeit ausgeht, daß die Entstehung aller Krebserkrankungen auf einigen gemeinsamen Grundmechanismen beruhen könnte (Varmus & Weinberg, 1994), lassen sich Erkenntnisse, die man an einem Krebstyp gewinnt, häufig unmittelbar auf viele andere übertragen. Aufgrund der Klonalität stellt *P. formosa* ein wichtiges Modellsystem dar, um jene genetischen Faktoren zu identifizieren, die an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine geeignete Methode gefunden werden, um die Mikrochromosomen bzw. mikrochromosomale Sequenzen bei *P. formosa* isolieren zu können. Dies ist eine Voraussetzung zur Identifizierung der Loci, die für die Ausbildung maligner Melanomen verantwortlich sind.

3.4.1 Methoden zur Isolierung ganzer Mikrochromosomen

Nimmt man an, daß ein Mikrochromosom ca. ein Zehntel der Größe des kleinsten A-Chromosoms aufweist, ist es geschätzt ca. 4.7 Mb groß. Dies entspricht 0.2% des gesamten Genoms. Zunächst wurden solche Methoden angewandt, die die Isolierung des gesamten Mikrochromosoms erlauben würden (Mikrosezierung, Pulsfeld-Gelelektrophorese, Chromosomen-Sortierung). Dafür wurden mehrere permanente Zelllinien aus Embryonen von Mikrochromosomen-Trägern etabliert, um die große Anzahl an benötigten (Metaphase-)Zellen zu gewährleisten. Diese Methoden waren jedoch nicht erfolgreich. Die Gründe dafür werden im Folgenden charakterisiert.

Mikrosezierung

Mit Hilfe der Mikrosezierung können chromosomale Regionen oder ganze Chromosomen isoliert werden. Die bis dahin unbekannt Sequenzen können anschließend mit einer DOP-PCR (degenerate oligonucleotide-primed PCR) unspezifisch amplifiziert werden und nach Fluoreszenz-Markierung als chromosomenspezifische Probe in einer in-situ-Hybridisierung eingesetzt werden.

Zunächst wurde versucht, die Mikrochromosomen nach dem klassischen Verfahren mittels einer Glasnadel, die an einem Mikromanipulator befestigt war, aus Metaphase-Präparaten herauszukratzen. Dies gelang nicht, da es ohne die

vorherige Entfernung des übrigen Chromosomenmaterials nicht möglich war, die Mikrochromosomen isoliert aufzunehmen. Die Schwierigkeiten begründen sich erstens in der Tatsache, daß Fischchromosomen sehr klein sind im Vergleich zu Mensch- oder Mauschromosomen, für die diese Methode etabliert wurde, und zweitens darauf, daß die Mikrochromosomen aufgrund ihrer minimalen Größe nur im Verband mit den Autosomen (A-Chromosomen) zu identifizieren sind.

In einem zweiten Ansatz wurde versucht, die Mikrochromosomen mittels „Laser Microbeam Microdissection“ (LLM) und „Laser Pressure Catapulting“ (LPC) in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Thalhammer am Institut für Kristallographie der LMU München zu isolieren (Schermelleh et al., 1999). Dazu müssen die Chromosomen auf einem beschichteten Objektträger präpariert werden. Chromosomenmaterial, welches zu nahe bei den zu isolierenden Mikrochromosomen liegt, wird mit relativ geringer Energie (0.2-0.3 μJ / Puls) mittels eines Lasers weggebrannt (ablatiert). Sind die Mikrochromosomen freigelegt, so kann die Membran, auf die die Chromosomen aufgetropft wurden, mit hoher Energie (0.5-0.6 μJ /Puls) geschnitten werden. Um die „ausgeschnittenen“ Mikrochromosomen sammeln zu können, wurde der Laser knapp unterhalb der Folie fokussiert und die Chromosomen-Membran-Inseln mit einem einzelnen Laserimpuls von 1-2 μJ in ein Glycerintröpfchen katapultiert, das auf einem Deckgläschen etwa 1 mm oberhalb des Objektträgers mittels eines Mikromanipulator angebracht war.

Obwohl bis zu 23 Mikrochromosomen nach dem Ablatieren und Isolieren katapultiert wurden, konnte mit der DOP-PCR kein Material amplifiziert werden. Kontroll-PCRs an genomischer DNA zeigten jedoch auch bei hohen Verdünnungen (0.08 pg) die erwartete Amplifikation über einen Bereich von 0.3 – 1.7 kb. Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß die Mikrochromosomen zu klein sind, um sie mittels Laserimpuls über eine Distanz von mehreren hundert Mikrometern in das Glycerintröpfchen katapultieren zu können.

Chromosomen-Sortierung

In einem FACS (fluorescence activated cell sorter) können Chromosomen unterschiedlicher Größe anhand ihres Fluoreszenzsignales (Hoechst 33258) erkannt werden und mit Hilfe des Lasers in verschiedenen Fraktionen getrennt werden. Aufgrund des enormen Größenunterschiedes zwischen den A-Chromosomen und den Mikrochromosomen (10:1) erschien die Methode zur Isolierung der Mikrochromosomen geeignet. Die Isolierung von Chromosomen aus

mitotischen Zellen wurde in Anlehnung an das von Cram et al.(1990) erarbeitete Protokoll durchgeführt. Dr. Andreas Simm am Institut für Physiologische Chemie II, Würzburg, führte die Chromosomen-Sortierung durch.

Allerdings konnten mit dieser Methode die Mikrochromosomen nicht von den A-Chromosomen abgetrennt werden. Die Mikrochromosomen sind vermutlich so klein, daß sie vor dem „Hintergrundrauschen“ chromosomaler Bruchstücke nicht aufzulösen waren.

Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese ermöglicht es, DNA-Moleküle, die größer sind als 50 kb aufzutrennen. Lineare DNA-Moleküle bewegen sich in einem elektrischen Feld derart, daß sie einen möglichst geringen Widerstand erfahren. Wird jedoch ein zweites elektrisches Feld in einem Winkel zu dem ersten angelegt, so müssen sich die Moleküle erst umorientieren, bevor sie entlang des neuen elektrischen Feldes wandern. Die Zeitspanne, die die Umorientierung benötigt, ist direkt proportional zu dem molekularen Gewicht: Je größer ein Molekül, desto länger benötigt es für die Umorientierung und desto weniger Zeit verbleibt pro Pulsdauer zur Wanderung entlang des elektrischen Feldes. Auf diese Weise können native Chromosomen unterschiedlicher Größe voneinander abgetrennt werden. Da die Größe der Mikrochromosomen nach eigener Schätzung etwa ein Zehntel der Größe des kleinsten A-Chromosoms beträgt, sollte eine Abtrennung mit Hilfe der PFGE möglich sein.

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde an einem Rotaphor Type 3 (Biometra) in einem 0.8% Agarosegel in 0.25 x TBE mit unterschiedlichen Zellzahlen (2×10^5 – $1,2 \times 10^6$) durchgeführt. Aufgrund der errechneten Größe der Mikrochromosomen wurde *Schizosaccharomyces pombe* (3 000 – 7000 kb) sowie *Saccharomyces cerevisiae* (200-2200 kb) als Größenmarker verwendet. Nach Lai et al. (1989) wurden die Bedingungen so gewählt, daß die Chromosomen von *S. pombe* sich gut auftrennen ließen (106-120° Rotation, 9-13°C Puffertemperatur, 1.3 V/cm, 60 min Pulsdauer). Trotz guter Auflösung der Markerchromosomen ließen sich keine Mikrochromosomen-spezifischen Banden erkennen. Dies könnte daran gelegen haben, daß die DNA-Menge der Mikrochromosomen zu gering war, um sie im Ethidiumbromid-gefärbten Gel sehen zu können.

3.4.2 Methoden zur Isolierung mikrochromosomaler Sequenzen

Das identische Bandenmuster von den Mikrochromosomen-Trägern (*P.f.* 637, *P.f.* 533, *P.f.* 857) und Individuen des ursprünglichen Stammes *P.f.* I im Multilocus DNA-Fingerprint zeigt, daß die paternale Introgression in Form von Mikrochromosomen kleiner ist als 100 Mb, da die Sensitivität der Methode bei etwa 5 % liegt. Damit wurden die Befunde von Scharl et al. (1995b) bestätigt. Rein rechnerisch ergibt sich jedoch für jedes Mikrochromosom eine Größe von ca. 4.7 Mb. Zur Auflösung bedarf es also sensitiverer Methoden. Mit Hilfe der AFLP-Technik konnten in der vorliegenden Arbeit erste mikrochromosomale Sequenzen identifiziert und z.T. charakterisiert werden.

AFLP

Da AFLP eine Methode ist, die auf der Vervielfältigung von Restriktionsfragmenten genomischer DNA durch PCR basiert, ist sie sehr sensitiv, allerdings können nur Fragmente des gesuchten Mikrochromosoms isoliert werden. Zu der bislang identifizierten Sequenz gibt es zum jetzigen Zeitpunkt in keiner der über das Internet verfügbaren Datenbanken Homologien. Deshalb läßt es sich auch nicht klären, ob es sich dabei um einen kodierenden oder nicht kodierenden Chromsomenabschnitt handelt. Mit dieser ca. 250 bp langen Sequenz als Hybridisierungssonde konnte in einem Southern Blot-Experiment mit *EcoRI*-geschnittener genomischer DNA von einem Black Molly-Männchen, zwei Individuen mit Mikrochromosomen sowie zwei Individuen ohne Mikrochromosomen sowohl ein Hybridisierungssignal etwa auf Höhe von ca. 14 kb detektiert werden, das bei allen getesteten Individuen vorhanden war, als auch ein Signal bei etwa 13 kb, das nur bei Mikrochromosomen-Trägern zu detektieren war. Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß sich auf den Mikrochromosomen je eine Kopie eines autosomalen Chromsomenabschnitts befindet, den evtl. alle Arten der Gattung *Poecilia* gemeinsam haben. Aufgrund des fehlenden Selektionsdruckes auf den Mikrochromosomen haben sich wahrscheinlich Mutationen angehäuft, die eine zusätzliche *EcoRI*-Schnittstelle hervorgebracht haben. Dies bestätigt frühere Daten (Scharl et al., 1991) und Vermutungen, daß *P. formosa* nicht weniger Mutationen ausgesetzt ist als andere Vertebraten.

Die relativ schwache Intensität der mikrochromosomalen Bande deutet darauf hin, daß es sich nicht um eine hochrepetitive Sequenz handelt. Damit besteht die Chance, daß es sich bei der isolierten Sequenz um einen Teilbereich eines Gens

handeln könnte. Bei den bislang identifizierten Sequenzen überzähliger Chromosomen handelte es sich meist um hochrepetitive Sequenzen (für einen Überblick siehe Camacho et al., 2000).

3.4.3 Evolution von Mikrochromosomen

Mikrochromosomen bzw. B-Chromosomen sind überzählige chromosomale Elemente bei Tieren und Pflanzen, die überwiegend genetisch inert sind. Sie unterscheiden sich von den normalen autosomalen Chromosomen (A-Chromosomen) durch ihre Morphologie, variable Anzahl, sowie Verhalten in Meiose und Mitose (Camacho et al., 2000). Meist werden sie als eigennützige genetische Elemente angesehen (McVean, 1995), die ursprünglich von A-Chromosomen stammen (Jones & Rees, 1982). Aber auch die Entstehung aus den Geschlechtschromosomen (Gonosomen) wurde für einige Arten vorgeschlagen (Sharbel et al., 1998). Eine Entwicklung zum B-Chromosom setzt allerdings eine von den A-Chromosomen unabhängige Evolution und Differenzierung voraus. Dies kann nur durch genetische (rekombinative) Isolierung von allen anderen chromosomalen Strukturen im Nukleus geschehen. Wie es trotz großer Homologien eines neuentstandenen Chromosomenfragments mit seinem Ursprungschromosom zur Unterdrückung der Paarung kommt, ist nicht geklärt.

In den meisten Fällen wird die Existenz von B-Chromosomen auf intraspezifische Ursprünge zurückgeführt, also auf die Entstehung aus dem eigenen Chromosomensatz (Camacho et al., 2000). Die Möglichkeit, daß B-Chromosomen von A-Chromosomen einer nahe verwandten Art stammen könnten (interspezifischer Ursprung), wurde ursprünglich von Battaglia (1964) erwogen, und fand Unterstützung bei Sapre & Deshpande (1987) und McVean (1995). Die Arten, die einen Fortpflanzungsmechanismus besitzen, der auf Chromosomeneliminierung beruht (spermienabhängige Parthenogenese), scheinen besonders anfällig für die Neuentstehung von B-Chromosomen zu sein. Wenn der Ausschlußmechanismus nicht richtig funktioniert, können B-Chromosomen als Überbleibsel unvollständig abgebauter A-Chromosomen in Erscheinung treten. Diese These wird auch von dem häufigen Auftreten aneuploider gynogenetischer Individuen gestützt (Beukeboom & Vrijenhoek, 1998). Aufgrund der Farbmarker, die die Mikrochromosomen bei *P. formosa* tragen (Schartl et al., 1995b), kann wohl auch hier ein interspezifischer Ursprung angenommen werden. Im Gegensatz zu der intraspezifischen Entstehung von B-Chromosomen sind Chromosomenfragmente, die

von einer anderen Art stammen, wahrscheinlich divers genug, um keine homologen Strukturen mit den A-Chromosomen auszubilden. Damit ist unmittelbar eine Situation gegeben, in der sich diese univalenten Strukturen unabhängig von den übrigen Chromosomen evoluiieren können. Da es sich bei *P. formosa* um eine apomiktische Art handelt (Monaco et al., 1984), wären auch die Voraussetzungen für eine intraspezifische Entstehung der Mikrochromosomen gegeben, was durch die Klonierung bislang nicht ausgeschlossen werden konnte.

3.4.4 Ausblick

Der Nachweis für eine interspezifische Entstehung muß demnach dadurch geführt werden, daß die auf die überzähligen Chromosomen beschränkten Sequenzen der einen Art auf den A-Chromosomen der anderen Art zu finden sind. Die isolierte Sequenz war mit ca. 250 bp jedoch zu kurz, um in einer in-situ-Hybridisierung ein detektierbares Signal liefern zu können. Dies wäre nur möglich gewesen, wenn es sich bei der Sequenz um ein repetitives Element gehandelt hätte. Durch Sequenzierung der entsprechenden autosomalen Loci von *P. formosa* und Black Molly kann diese Frage in Zukunft geklärt werden.

Ziel ist es, die Gene auf den Mikrochromosomen, die für die Ausbildung maligner Melanome bei *P. formosa* verantwortlich sind, sowie deren Herkunft zu bestimmen. Dazu müssen ausgehend von den Befunden dieser Arbeit in Zukunft weitere mikrochromosomale Sequenzen mit Hilfe der AFLP-Methode identifiziert werden, um eine repräsentative Verteilung über das gesamte Mikrochromosom zu erhalten. Mit diesen Sequenzen kann anschließend in vorhandenen Genbanken nahe verwandter Arten (z.B. *Xiphophorus*) nach Homologien gesucht werden. Dies wird die Sequenzierung und Charakterisierung großer zusammenhängender DNA-Bereiche ermöglichen und somit erlauben, funktionelle Genabschnitte zu identifizieren. Deren Expression kann dann in Mikrochromosomen-tragenden *P. formosa* analysiert werden.

Zusätzlich soll untersucht werden, ob die erhaltenen mikrochromosomalen Sequenzen spezifisch für das langfristig instabile zweite und dritte Mikrochromosom sind oder ob sie auch auf dem stabil vererbten Mikrochromosom lokalisiert werden können.

4 Paternale Introgression bei *P. formosa* in natürlichen Populationen unter besonderer Berücksichtigung von Triploidie

4.1 Einleitung

Obwohl man um die wichtige Rolle der Polyploidie bei der Evolution von Pflanzen wußte, war man doch lange der Meinung, daß Polyploidie bei der Evolution von Vertebraten keine wesentliche Bedeutung zukommt. Dies änderte sich 1966 mit der Entdeckung einer tetraploiden gonochoristischen Froschart (*Odontophrynus americanus*). Ohno (1974) hält Polyploidisierung bei Fischen und Amphibien wegen der Genduplikation für einen Meilenstein bei der Evolution von höheren Vertebraten. Zusätzlich stellt Polyploidie einen wichtigen Mechanismus der Speziation dar. Entstehen z.B. tetraploide Individuen in einer diploiden Population, so gingen aus Paarungen der beiden triploide Individuen hervor, die aufgrund ihrer ungeraden Anzahl an Chromosomensätzen Schwierigkeiten bei der Meiose I haben werden und mit größter Wahrscheinlichkeit steril sein werden. Damit sind polyploide Individuen von ihren diploiden Vorfahren reproduktiv isoliert (Schultz, 1979).

Dennoch fällt auf, daß im Vergleich zu Pflanzen nur wenige Tiere mehr als zwei Chromosomensätze aufweisen. Muller (1925) vermutete, daß sich polyploide Linien bei Tieren deshalb nicht etablieren können, da ansonsten die Geschlechtsdeterminierung zerschlagen würde. Dagegen argumentiert Orr (1990), daß heteromorphe Geschlechtschromosomen und die daraus resultierende Dosiskompensation der Entstehung von Polyploidie entgegenwirken. Demnach sollte Polyploidie bei Arten möglich sein, die keine heteromorphen Geschlechtschromosomen aufweisen, wie in diözischen Pflanzen, einigen Amphibien (Bogart, 1980) und in den meisten Fischarten (Morescalchi, 1992). Siehe dazu auch Kapitel 5.4.4.

Tatsächlich kommen bei Vertebraten polyploide Formen regelmäßig bei Fischen, Amphibien und Reptilien vor, während sie bei Vögeln nur selten zu finden sind (Solarì & Fechheimer, 1988; Comings & Okada, 1971) und bei Säugetieren nicht lebensfähig sind. Die einzigen lebensfähigen Ausnahmen stellten sich später als 2n/3n-Mosaik (Fechheimer et al., 1983) bzw. als Fehlinterpretation heraus (Gallardo et al., 1999). Polyploide Formen konnten bei Fischen z.B. im *Poeciliopsis monacha-*

lucida-Komplex (3n), im *Phoxinus eos-neogaeus*-Komplex (3n), bei *Barbus barbii* (4n) und *Cyprinus carpio* (4n), bei *Carassius auratus* (4n), *C. gibelio* und *langsdorfii* (3n), bei *Cobitis* (3n, 4n) und *Leuciscus alburnoides* (3n) identifiziert werden. Pandian & Koteeswaran (1998) nennen Veröffentlichungen zu natürlich aufgetretenen hexadecanploiden Fischen. Bei Amphibien findet sich neben dem *Rana esculenta*-Komplex (3n) und dem *Bufo viridis*-Komplex (3n, 4n) die größte Bandbreite an Ploidiegraden (2n bis zu 12n) bei *Xenopus* (Schmid & Steinlein, 1991). Auch bei Reptilien kommen z.B. bei der Gattung *Cnemidophorus* verschiedene triploide Formen vor.

Interessanterweise findet man fast immer einen Zusammenhang zwischen asexueller Fortpflanzung und Polyploidie: 64% der bekannten eingeschlechtlichen Arten sind polyploid (Avisé et al., 1992). Die Frage nach Ursache und Wirkung bleibt jedoch ungeklärt (Benazzi, 1982; Suomalainen et al., 1987). Einige Wissenschaftler vermuten, daß zufällige Polyploidisierung (z.B. Triploidie) eine asexuelle reproduktive Strategie notwendig machte, um der Sterilität aufgrund gestörter Meiose zu entkommen (Benazzi & Lentati, 1979; Lanier & Kirkendall, 1986). Andere wiederum sehen die asexuelle Fortpflanzung als Voraussetzung an, damit eine Erhöhung des Ploidiegrades überhaupt toleriert werden kann (Schultz, 1969). Christensen (1960) hingegen schlägt eine gleichzeitige Evolution der beiden Ereignisse vor. Unabhängig von der Reihenfolge ihrer Entstehung handelt es sich sowohl bei den asexuellen Fortpflanzungsmodi als auch bei Polyploidie um von der zweigeschlechtlichen Fortpflanzung abgeleitete Merkmale bei Tieren (Suomalainen et al., 1987).

Für *P. formosa* jedoch kann anhand der vorhandenen Daten angenommen werden, daß durch Hybridisierung zunächst ein diploider gynogenetischer Organismus entstanden ist. Aufgrund der asexuellen Fortpflanzungsweise entstanden durch paternale Introgression gelegentlich triploide Individuen, die sich ebenfalls gynogenetisch fortpflanzten (Hubbs, 1955; Balsano et al., 1972; Schultz, 1979; Rasch et al., 1982). Auf diese Weise existieren in bestimmten Gebieten diploide und triploide *P. formosa* sympatrisch.

Auch bei asexuellen Arten spielt Polyploidie eine große Rolle hinsichtlich ihrer Evolution.

- Paternale Introgression in Form eines ganzen Chromosomensatzes kann für eine invadierende asexuelle Art von Vorteil sein, da die Expression paternaler Gene zur phänotypischen Anpassung an die Wirtsart (sexuelle Mimikry) beiträgt und damit die Chancen auf Paarungen mit den Männchen der Wirtsart erhöht (Lima et al., 1996; Schultz, 1969). Zudem werden dadurch Gene erhalten, die sich offensichtlich in dem Umfeld als besonders geeignet erwiesen haben. Ein solcher Chromosomensatz erleichtert demnach eine lokale Adaption (Bulger & Schultz, 1982).
- Im Gegensatz zu sexuellen Arten, ist eine Ploidieerhöhung bei asexuellen Arten nicht mit reproduktiven Schwierigkeiten verbunden. Insofern könnte Triploidie vielleicht den Ausgangspunkt bilden für eine weitere Erhöhung auf vier Chromosomensätze. Da die Wiederherstellung einer geraden Anzahl an Chromosomensätzen (z.B. $4n$) eine Voraussetzung für normale Meiose und sexuelle Fortpflanzung ist, könnte dieser Weg zurück zur Sexualität führen (Schultz, 1979; Schultz & Fielding, 1989). Die meisten Speziationsereignisse aufgrund von Polyploidie weisen triploide Zwischenstufen auf (deWet, 1979).
- Die de-novo Entstehung von polyploiden Klonen gewährleistet genetische Variation. Von *Poeciliopsis* ist bekannt, daß die durchschnittliche Heterozygotie von Triploiden mit 0.51-0.54 gegenüber Diploiden (0.39-0.43) deutlich erhöht (Vrijenhoek, 1979). Balsano et al.(1989) fanden eine erhöhte klonale Vielfalt von *P. formosa* im Río Soto la Marina-Flußsystem, was sie auf die Neuentstehung triploider Klone zurückführten. Eine erhöhte genetische Vielfalt würde (1) eine unterschiedliche ökologische Nutzung der Ressourcen ermöglichen und (2) den evolutiven Wettbewerb mit Parasiten begünstigen.
- Paternale Introgression könnte frisches genetisches Material in den asexuellen Organismus einschleusen, so daß die Auswirkung der Anhäufung von schädlichen Mutationen (Muller's ratchet and the mutational meltdown) gemildert wird (Muller, 1964; Lynch et al., 1993).

4.1.1 Paternale Introgression bei *P. formosa*

Der genaue Mechanismus, wie bei der gynogenetischen Fortpflanzung von *P. formosa* normalerweise das väterliche Genom nach der Aktivierung der diploiden Oozyte inaktiviert oder ausgeschlossen wird, ist bislang nicht bekannt. Bei fehlerhaftem Arbeiten des Mechanismus kann es aufgrund von Karyogamie zu einer tatsächlichen Befruchtung der diploiden Oozyte durch das haploide Spermium kommen. Die Folge sind triploide Tiere, die neben einem ursprünglichen *mexicana*- und einem *latipinna*-Genom nun ein weiteres „neues“ Genom aufweisen (Allotriploidie). Dabei werden sowohl maternale als auch paternale Gene exprimiert (Hubbs & Hubbs, 1946b; Balsano et al., 1972; Monaco et al., 1982). Labordaten lassen vermuten, daß etwa 1.5 % der Nachkommen diploider *P. formosa* triploid sind (Balsano et al., 1989). Es können aber auch nur Teile des Spermiengenoms in der Oozyte zurück bleiben, die dann im Karyotyp als sog. Mikrochromosomen zu identifizieren sind (Schartl et al., 1995b). Weitere Formen paternaler Introgression z.B. in Form von einzelnen oder mehreren Chromosomen konnten bislang nicht identifiziert werden.

4.1.2 Triploidie

Die Entstehung triploider Nachkommen von diploiden *P. formosa* im Labor wurde bereits von Rasch et al. (1965), Schultz & Kallman (1968), Prehn & Rasch (1969), Rasch & Balsano (1974), Strommen et al. (1975a) und Nanda et al. (1995) beschrieben. Allerdings waren alle bisher aufgetretenen Triploiden steril.

Auch aus den natürlichen Lebensräumen sind triploide *P. formosa* vorwiegend aus dem Soto la Marina-Flußsystem bekannt (Rasch et al., 1970; Menzel & Darnell, 1973; Balsano et al., 1972; Turner et al., 1983).

Diese triploiden Freilandfänge sind hingegen fertil und geben ihr Genom klonal an ihre Töchter weiter (Rasch & Balsano, 1973; Rasch & Balsano, 1974; Strommen et al., 1975b). Die Häufigkeit dieser natürlichen Triploiden variiert stark zwischen verschiedenen Habitaten, aber auch innerhalb eines Habitats variieren die Zahlen stark von Jahreszeit zu Jahreszeit, sowie von Jahr zu Jahr (Rasch & Balsano, 1974).



Abbildung 21: Triploides *P. formosa*-Weibchen.

Interessanterweise gibt es kaum Berichte von Triploiden aus den Habitaten, in denen *P. formosa* mit *P. latipinna* beheimatet ist. Unter 5000 *P. formosa*, die auf Forschungsreisen zwischen 1964 und 1982 in der Umgebung von Brownsville (TX, USA) untersucht wurden (Rasch & Balsano, 1989), befanden sich nur 4 Triploide (0.08 %). Drei wurden im Jahr 1967 gefangen, ein weiterer Triploider im Jahr 1977, und das obwohl in den dazwischen liegenden Jahren 11 Sammelreisen unternommen worden waren. Hubbs (1964) und Kallman (1962b) berichteten trotz intensiver Untersuchungen ebenfalls nicht von triploiden Individuen aus diesem Gebiet.

Auch an der südlichen Verbreitungsgrenze von *P. formosa* (Tampico, Río Tuxpan) sind triploide Tiere eine Rarität. Es wird nur von einem Triploiden aus dem Río Tuxpan berichtet (Monaco et al., 1984), wo *P. formosa* überwiegend mit der Unterart *P. mexicana mexicana* vorkommt. Balsano et al. (1989) führen das seltene Auftreten triploider Tiere auf die geringere Häufigkeit der Unterart *P. mexicana limantouri* in diesen Gebieten zurück. *P. mexicana limantouri* ist der vorherrschende bisexuelle Wirt in den nördlicheren Flußsystemen, in denen Triploidie häufig auftritt. Diese These wird unterstützt von der Tatsache, daß während dreijährigen Züchtens von *P. formosa* mit *P. mexicana mexicana*-, *P. latipunctata*- und *P. latipinna*-Männchen keine triploiden Nachkommen erhalten wurden (Balsano et al., 1989).



Abbildung 22: Zusammenfassende Darstellung des Fortpflanzungskomplexes bei *P. formosa* (nach Dawley, 1989). Durch Paarung eines *P. latipinna*-Männchens (II) mit einem *P. mexicana*-Weibchen (mm) kommt es zur Entstehung eines diploiden unisexuellen Hybriden, *P. formosa* (Im). Dieser pflanzt sich normalerweise durch Elimination des Spermien-genoms (x) gynogenetisch fort. In seltenen Fällen findet Karyogamie statt, so daß triploiden Individuen entstehen. Diese entstehen überwiegend in den Gebieten, in denen *P. formosa* mit der nördlichen Unterart *P. mexicana limantouri* sympatrisch vorkommt. Aus den Gebieten, in denen *P. formosa* mit *P. mexicana mexicana* oder *P. latipinna* sympatrisch lebt, gibt es nur wenige Berichte von Triploiden.

4.1.3 Koexistenz von *P. formosa* und ihren Wirten

Der Frage, wie unisexuelle *P. formosa* mit ihren sexuellen Wirten koexistieren, sind bereits einige Forscher nachgegangen. Balsano et al. (1989) sehen es als erwiesen an, daß nicht Spermienlimitierung die Fortpflanzung asexueller Weibchen reguliert, sondern daß sich die beiden Arten stark genug unterscheiden, um nicht um identische Ressourcen zu konkurrieren („frozen niche-variation“ Hypothese, Vrijenhoek, 1978; Wetherington et al., 1989).

Während *P. mexicana*-Weibchen überwiegend in flacheren Gewässern der oberen Flußläufe vorkamen, fanden sich *P. formosa*-Weibchen vermehrt flußabwärts und bevorzugten größere Wasserkörper (Balsano et al., 1989). So wurden beispielsweise von 1970 bis 1978 mehr als 10000 *Poecilia*-Weibchen an 20 Fundorten im Río Soto la Marina-Flußsystem gefangen und untersucht, wie hoch der Anteil an sexuellen und gynogenetischen Weibchen war (Balsano et al., 1989). Dabei wurde festgestellt, daß die Häufigkeit an *P. formosa* bei Barretal (49.7 %) und Nuevo Padilla (50.4 %) am höchsten war. Es wurde vermutet, daß die geographischen Unterschiede im Verhältnis von sexuellen zu asexuellen *Poecilia* mit der Habitatdiversität zusammenhängen. Versuche zur Habitatwahl wurden im Labor sowie im Freiland unternommen (Balsano et al., 1981). Unter hohen Populationsdichten bevorzugten *P. mexicana* sandigen Untergrund, während *P. formosa* Kiesboden aufsuchten. Monaco et al. (1978) und Hubbs (1964) konnten zeigen, daß sexuelle und asexuelle Weibchen zu unterschiedlichen Zeiten rezeptiv werden, so daß für jede Art jeweils genügend fertile Männchen zur Verfügung stehen.

4.1.4 Klonale Variabilität

Um die klonale Struktur natürlicher Populationen unisexueller Vertebraten nachzuweisen, wurden lange Zeit Gewebetransplantationen durchgeführt. Untersuchungen von Kallman (1962a; 1964) an *P. formosa*-Weibchen aus dem Río Grande bei Brownsville zeigten, daß die meisten Individuen 2 bis 3 sog. Hauptklonen zugeordnet werden konnten. Zusätzlich detektierte er 8 Klone, denen nur wenige Individuen zugeordnet werden konnten. Das Auftreten genetisch unterscheidbarer Individuen innerhalb einer asexuellen Art (Klone) wird als klonale Variabilität bezeichnet. Interessanterweise ist die genetische Variabilität in Gebieten, in denen Triploide vorkommen, deutlich höher als in den anderen (Balsano et al.,

1989). Demnach gibt es außer Mutation noch andere Mechanismen, die genetische Variation schaffen. Die Autoren vermuten daher, daß paternale Introgression in Form von Triploidie einen Beitrag zu der hohen genetischen Variabilität der verschiedenen Klone von *P. formosa* im Flußsystem des Río Soto la Marina leistet. Bislang ist jedoch nicht geklärt, ob diese klonale Variabilität auf mehrere Triploidisierungsereignisse zurückzuführen ist, oder auf Veränderungen des ursprünglichen Klons.

4.1.5 Fragestellung

Bis 1993 wurden triploide *P. formosa* im Río Soto la Marina-Flußsystem intensiv erforscht. Welche Mechanismen jedoch diploiden und triploiden Linien eine Koexistenz ermöglichen, ist nicht geklärt. Wenn Polyploidie wirklich so viele Vorteile bietet, und triploide *P. formosa* gegenüber diploiden eine höhere Überlebensrate aufweisen (Balsano et al., 1983), so stellt sich die Frage, warum diploide *P. formosa* nicht von triploiden verdrängt werden. Obwohl die Rolle der triploiden *P. formosa* ungeklärt ist, mag doch ihre Häufigkeit und ihr ökologischer Erfolg ein Maß für das evolutive Potential dieser unisexuellen Bioform sein.

Bisher wurden triploide Individuen entweder über Plasmaalbumin-Muster (Balsano et al., 1972), Muskelprotein-Muster (Monaco et al., 1982), DNA Feulgen-Messung an Blutausschnitten (Rasch et al., 1970; Rasch & Balsano, 1974) oder Schuppenepithel (Strommen et al., 1975a) identifiziert (für einen Überblick siehe Pandian & Koteeswaran, 1998). Dabei handelt es sich überwiegend um Methoden, die bei kleinen Fischen, wie Poeciliiden, aufwendig durchzuführen sind. Es sollte daher im Rahmen dieser Arbeit eine einfache Methode entwickelt werden, mit der zunächst ganze Populationen auf ihren Ploidiegrad hin untersucht werden können, ohne die Tiere töten zu müssen.

Mit der effizienten Identifizierung und molekularbiologischen Untersuchung von Triploiden soll der Frage nachgegangen werden, welche biologische Bedeutung paternale Introgression für *P. formosa* hat:

- Handelt es sich bei der Entstehung triploider Individuen nur um einen „Fehler“ ohne evolutive Bedeutung für den Organismus?
- Wie viele triploide Klone gibt es? Sind bestimmte Klone häufiger und somit erfolgreicher?

- Haben triploide einen selektiven Vorteil gegenüber diploiden aufgrund ihrer höheren genetischen Diversität?
- Können paternale und maternale Gene über die Zwischenstufe „Triploidie“ einen Weg zurück in die sexuelle Population finden?

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Fische

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden Wildfänge bzw. Flossenbiopsien von Wildfängen aus den Fundorten 21, 28 und 29 verwendet. Die nach Würzburg importierten Wildfänge wurden unter Standardbedingungen gehalten.

4.2.2 Größenmessung der Fische

Zur Größenmessung lebender Fische wurden die Standardlänge (SL), die Rumpftiefe (RT) sowie die Breite der Schwanzwurzel (in mm) herangezogen (Abbildung 23).

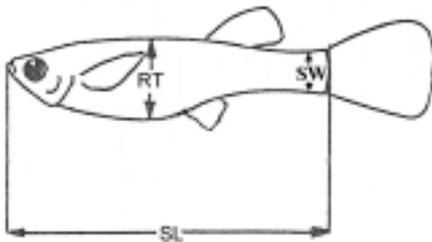


Abbildung 23: Parameter, die zur Bestimmung der Größe eines Fisches herangezogen wurden: SL = Standardlänge, RT = Rumpftiefe, SW = Breite der Schwanzwurzel (nach Schröder et al., 1996).

4.2.3 Bestimmung des DNA-Gehalts mittels Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie kann die Menge der Kern-DNA nach Anfärbung mit DNA-spezifischen Farbstoffen ermittelt werden.

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes bei *P. formosa* werden den Tieren die schnell regenerierenden Rückenflossen abgeschnitten (Lamatsch et al., 2000b). Infektionen können dadurch vermieden werden, daß die Fische für einige Tage in einem Becken mit leicht erhöhten Salzgehalt (+0.2%) gehalten werden.

Um den DNA-Gehalt durchflußzytometrisch messen zu können, muß eine Einzelzellsuspension hergestellt werden: Das Material wird in 2.1% Zitronensäure / 0.5% Tween 20 möglichst klein geschnitten und daraufhin durch eine 0.6x25mm Kanüle gedrückt, bis diese nicht mehr verstopfte. Die so erhaltenen Einzelzellen werden bei Raumtemperatur 20 min vorsichtig geschüttelt, abzentrifugiert und in 70% Ethanol bei 4°C 4-14 h fixiert.

Zur Färbung werden die fixierten Zellen wieder durch Zentrifugation gesammelt und mit 1 ml 0.5% Pepsin in 0.1 M HCl versetzt. Nach 15 minütigem Schütteln wird 1 ml DAPI-Lösung (5.9% tri-Natriumcitrat 2 H₂O, 0.0002% DAPI) zugegeben. Nach einer Färbezeit von 1-3 Stunden können die Proben vermessen werden. Unmittelbar vor dem Messen im Durchflußzytometer müssen die Flossenzellsuspensionen filtriert werden (50 µm, Partec), um ein Verstopfen der feinen Düse zu verhindern.

Als interner Standard werden 100 µl heparinisierte rote Blutkörperchen eines weiblichen Haushuhns (*Gallus gallus*) in PBS-Puffer aufgenommen und wie die fixierten Fischzellen behandelt. Aufgrund der hohen Zelldichte werden die Hühner-Erythrozyten allerdings auf 7 ml mit DAPI verdünnt.

Die durchflußzytometrischen Analysen wurden an einem Cell Analyzer CA II der Firma Partec, Deutschland, durchgeführt. Pro Probe wurden mindestens 10 000 Zellen gemessen. Die Graphen wurden mit dem Programm SlideWrite Plus (Advanced Graphics Software Inc., CA, USA) erstellt.

4.2.4 Präparation von Mitose-Chromosomen aus Fischorganen

Für die Chromosomen-Präparationen werden Fische für 12-16 Stunden in 0.03% Colchizin gesetzt. Nach dem Abtöten der Fische in Eiswasser und anschließendem Dekapitieren werden die besonders teilungsaktiven Organe Milz, Kiemen und Kopfniere in 46 mM KCl zerkleinert und 45-60 min bei Raumtemperatur gerührt (Hypotonie). Die abzentrifugierten Zellen werden in eiskaltem Fixativ (Methanol: Eisessig, 3:1, v:v) aufgenommen und bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Nach einer Fixierungszeit von mindestens 12 Stunden werden die Zellen wiederum durch Zentrifugation gesammelt und in einem kleinen Volumen frischen Fixativs aufgenommen, so daß eine trübe Zellsuspension entsteht. Je 2-4 Tropfen dieser Suspension werden auf eiskalte, nasse Objektträger aus einer Höhe von ca. 30 cm aufgetropft. Durch sanfte Wärmeeinwirkung, z.B. über dem Bunsenbrenner, spreiteten sich die Chromosomen besser und das Präparat trocknet anschließend bei Raumtemperatur schneller.

Giemsa-Färbung

Für eine herkömmliche Bestimmung des Karyotyps werden die Präparate ca. 20 min in 5 %iger Giemsa-Lösung (pH 6.8) gefärbt und anschließend mit Histokitt® (Assistent) dauerhaft eingedeckt.

4.2.5 Isolierung hochmolekularer DNA

Die dem Fisch entnommenen Organe (Gehirn, Augen, Leber, Muskel und – falls nicht für Chromosomenpräparation benötigt – auch Niere, Milz und Kiemen) werden frisch oder nach Lagerung bei -80°C nach der Methode von Blin & Stafford (1976) in 2 ml Lysispuffer aufgenommen und mit einem Glashomogenisator vorsichtig zerkleinert. Anschließend werden die Proben 3 h bei 80°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur füllt man die Suspension in SST-Röhrchen (Becton Dickinson, Tuherford, New Jersey, USA) um und versetzt sie mit $\frac{1}{2}$ Volumen Phenol (äquilibriert mit 0.1 M Tris-Cl, pH 8.0). Nach 15 minütigem Schwenken auf einem Taumelschüttler wird $\frac{1}{2}$ Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und weitere 15 min geschüttelt. Zur Phasentrennung werden die SST-Röhrchen 10 min mit 2000 rpm (Labofuge^{GL}, Heraeus) bei Raumtemperatur zentrifugiert, und die wäßrige Phase anschließend mit dem einfachen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol 15 min gemischt. Nach erneuter Zentrifugation wird die wäßrige Phase in ein Reagenzglas überführt und mit 2.5 Volumina eiskaltem Ethanol p.a. gefällt. Die hochmolekulare DNA wird auf einen Glasstab gewickelt, kurz in 70% Ethanol gewaschen und in TE pH 8.0 bei 4°C gelöst.

Lysispuffer: 200 mM NaCl
100 mM EDTA pH 8.0
0.2% SDS
100 µg/ml Proteinase K
(frisch zugesetzt)

TE: 10 mM Tris-Cl pH 8.0
1 mM EDTA pH 8.0

Vergleichende Konzentrationsbestimmung im Agarosegel

DNA unbekannter Konzentration wird neben einer mit *SaI* geschnittenen λ -Phagen-DNA bekannter Konzentration auf ein 0.8% Agarosegel aufgetragen, welches nach der Elektrophorese wie unter 2.3 beschrieben gefärbt und photographiert wird. Die Konzentration im Vergleich zum Standard kann unter Verwendung der Software Easy plus Rev 3.16 von Herolab (Wiesloch, Deutschland) ermittelt werden.

4.2.6 Multilocus DNA-Fingerprint

Restriktionsenzymverdau genomischer DNA

5 μ g genomische DNA werden mit 10 U des Restriktionsenzym *HinfI* geschnitten (14 h, 37°C) und durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5.5) und 2.5 Volumina eiskaltem 100 % Ethanol gefällt. Nach zweistündiger Inkubation bei -20°C werden die Fragmente 30 min bei 13000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf, 4°C) abzentrifugiert, in 70 % Ethanol gewaschen und in 18 μ l TE-Puffer gelöst.

Gelelektrophorese

Nach Zugabe von 2 μ l Probenpuffer werden die Proben auf einem 0.8 % Agarosegel in 1 x TBE bei 1.5 V/cm für 45 h bei RT aufgetrennt. Als Größenvergleich wird je eine Spur *BstEII* bzw. *EcoRI* / *HindIII* geschnittene λ -Phagen-DNA aufgetragen. Nach Beendigung der Auftrennung wird das Gel auf Whatman-Papier ca. 4 h bei 70°C auf dem Geltrockner unter Vakuum getrocknet. In diesem Zustand kann das Gel gelagert bzw. verschickt werden. Die folgenden Arbeitsschritte wurden routinemäßig im Labor von Prof. J.T. Eppelen, am Institut für molekulare Human-genetik der Universität Bochum, durchgeführt.

Denaturierung/Neutralisierung des Gels

Das getrocknete Gel wird in destilliertem Wasser rehydriert, bis es sich vom Whatman-Papier ablöst. Anschließend wird es unter leichtem Schwenken für je 30 min bei Raumtemperatur denaturiert und anschließend neutralisiert. Nach 15

minütigen Waschen in 6 x SSC (pH 7.0) wurden die Gele mit Hilfe einer sterilen Plastikpipette gerollt und separat in Hybridisierungsgefäße überführt.

Denaturierungslösung:	0.5 M NaOH 0.15 M NaCl
Neutralisationslösung:	0.5 M Tris, pH 8.0 0.1 M NaCl
20 x SSC:	3 M NaCl 0.3 M Na-Citrat, pH 7.0

Direkte In-Gel-Hybridisierung

Der Vorteil gegenüber der Methode des Southern-Blots besteht darin, daß kein zeitaufwendiger Transfer auf eine Membran nötig ist und somit auch keine DNA durch diesen Transfer verloren gehen kann. Zweitens ist keine Vorhybridisierung nötig. Ein weiterer Vorteil ist die Tatsache, daß die Oligonukleotide wesentlich effektiver an DNA-Fragmente in Agarosegelen binden können als an immobilisierte DNA auf Membranen. Die direkte In-Gel-Hybridisierung ermöglicht es somit, Banden spezifischer Sequenz mit Hilfe radioaktiv markierter „single repeat“-Oligonukleotide unter den elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmenten mit geringerem Zeitaufwand und höherer Auflösung sichtbar zu machen. Damit entsteht – wie bei einem Southern Blot-Analyse ein individuelles Bandenmuster, ein sog. Fingerabdruck.

Die radioaktive Markierung der Hybridisierungsproben erfolgt in 1 x Kinasepuffer in einem Volumen von 10 µl unter Verwendung von 10 pmol Oligonukleotid, 5 µl [γ ³²P] ATP (5000 Ci/mM) und 1.5 U T4 Polynukleotidkinase (Boehringer Mannheim) für 15 min bei 37°C. Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0.5 M EDTA pH 8.0 werden die markierten Proben auf 100 µl mit TE-Puffer aufgefüllt und bis zur Aufreinigung bei –20°C gelagert.

10 x Kinasepuffer: 670 mM Tris-HCl, pH 8.0
 100 mM MgCl₂
 100 mM DTT

Die Abtrennung von nicht-inkorporiertem [γ ³²P]ATP erfolgt durch Ionenaustausch-Chromatographie über eine Sephadex G-50 Spin Säule.

Die Hybridisierungstemperatur sowie die Temperatur für den folgenden warmen Waschschrift werden in Anlehnung an die Zusammensetzung der Oligomere bestimmt: $T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{G} + \text{C}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{A} + \text{T})$

Die optimale Hybridisierungstemperatur liegt erfahrungsgemäß 5°C unter der Dissoziationstemperatur, so daß die aufgelisteten Oligomere bei den folgenden Temperaturen hybridisiert werden:

(GATA) ₄ :	T _{Hyb} =35°C
(GGAT) ₄ :	T _{Hyb} =43°C
(GA) ₈ , (CA) ₈ :	T _{Hyb} =48°C

Die Hybridisierung erfolgt für 3-4 h in 10 ml Hybridisierungslösung (0.025 ml/ cm² Gel), der 1 x 10⁶ cpm/ml des markierten Oligonukleotids zugegeben werden. Das Gel wird anschließend zweimal 30 min in 500 ml 6 x SSC bei Raumtemperatur gewaschen, gefolgt von einem stringenten Waschschrift bei Hybridisierungstemperatur (1.5 min) und weiteren 30 min bei Raumtemperatur.

Hybridisierungslösung: 5 x SSPE
 5 x Denhardt's
 0.1 % SDS
 15 µg/ml *E. coli*-DNA
 1 x 10⁶ cpm/ml radioaktive Sonde (denat.)

50 x Denhardt's: 50 mM Tris-Cl pH 7.5
 1 % Ficoll
 1 % BSA
 1 % Polyvinyl-Pyrrolidon

Zur Anfertigung der Autoradiographie werden die Gele luftblasenfrei in Frischhaltefolie verpackt und über Nacht exponiert. Die Röntgenfilme (Kodak X-AR) wurden in einer Entwicklungsmaschine Compact 35 der Fa. Protec entwickelt.

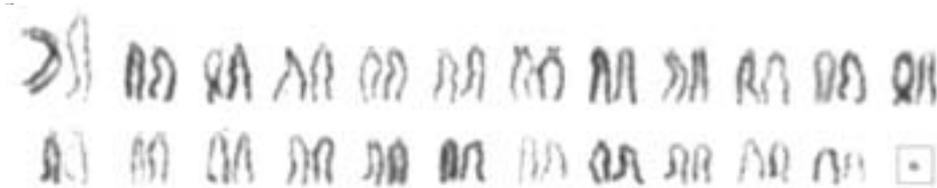
Die Agarosegele können zu 2 bis 3 weiteren Hybridisierungen herangezogen werden. Dazu wird das Gel ca. 30 min bei 65°C in 5 mM EDTA pH 8.0 gewaschen und das erfolgreiche Entfernen der radioaktiven Probe anschließend mit einem Phosphoimager überprüft. Nach 15 minütigem Äquilibrieren in 6 x SSC bei Raumtemperatur kann das Gel direkt mit einer weiteren Sonde hybridisiert oder aber getrocknet und aufbewahrt werden.

4.3 Ergebnisse

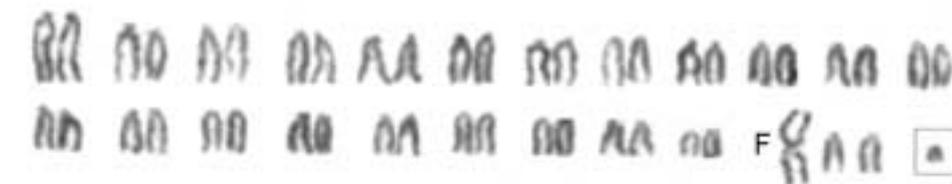
4.3.1 Analyse chromosomaler Klone

Seit 1996 konnten von Fundort 28 insgesamt 58 Wildfänge karyotypisch bestimmt werden. Davon wiesen 34 Tiere den normalen Karyotyp ($2n = 46$ akrozentrische Chromosomen) auf, 2 besaßen zusätzlich zu dem normalen Karyotyp ein Mikrochromosom ($2n = 46 + m$, Abbildung 24A), 12 zeigten ein Fusionschromosom (F) und ein etwas größeres Mikrochromosom ($45 + (F) + M$, Abbildung 24B), 7 waren triploid ($3n = 69$) und 4 zeigten zusätzlich zu dem triploiden Karyotyp ein Mikrochromosom ($3n = 69 + m$, Abbildung 24C). Niemals wurde ein Individuum mit 2 Mikrochromosomen gefunden.

A



B



C

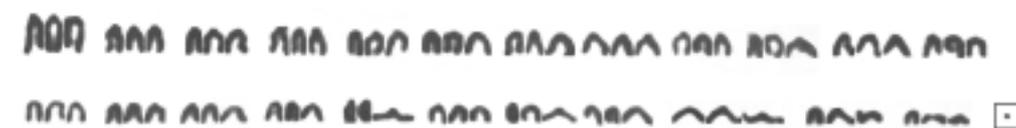


Abbildung 24: Natürliche Klone von F.O. 28. A) diploider Karyotyp mit $2n = 46$ akrozentrische Chromosomen und einem Mikrochromosom, B) diploider Karyotyp mit einem Fusionschromosom und einem ungewöhnlich großen Mikrochromosom, C) triploider Karyotyp $3n = 69$ akrozentrische Chromosomen und einem Mikrochromosom. Zum Größenvergleich siehe Abbildung 25. A und B nach Scharl et al. (1995b)

Von Fundort 29 wurden nur 4 Individuen karyotypisiert. Darunter waren 3 mit normalen diploiden Karyotyp, sowie ein triploides. Von Fundort 21 wurden bisher nur 5 Tiere karyologisch untersucht. Diese waren – wie schon durch die Durchflußzytometrie bestimmt – alle diploid und wiesen keine überzähligen Chromosomen auf.

Tabelle 2: Darstellung der verschiedenen chromosomalen Klone an den Fundorten 21, 28 und 29 aus den Jahren 1996 bis 1998. $2n = 46$ bezeichnet den normalen diploiden Karyotyp, $2n = 46 + m$ bezeichnet Tiere mit einem zusätzlichen Mikrochromosom, $45 + (F) + M$ bezeichnet einen Klon, der ein Fusionschromosom (F) und ein etwas größeres Mikrochromosom aufweist, bei $3n = 69$ handelt es sich um triploide Tiere ohne überzählige Chromosomen und $3n = 69 + m$ steht für einen triploiden Karyotyp mit einem Mikrochromosom.

Fundort	$2n = 46$	$2n = 46 + m$	$2n = 45 + (F) + M$	$3n = 69$	$3n = 69 + m$	N
21	5	0	0	0	0	5
28	34	2	12	7	4	58
29	3	0	0	1	0	4

4.3.2 Etablierung einer Methode zur minimal-invasiven Bestimmung des Ploidiegrades

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie können Individuen anhand von minimal-invasiven Rückenflossenbiopsien als diploid oder triploid bestimmt werden. Um den genauen DNA-Gehalt pro Nukleus bestimmen zu können, wird das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (die bestimmten Kanälen zugeordnet werden) von Probe und Standard gebildet und mit dem bekannten DNA-Gehalt des Standards multipliziert.

$$\text{Kanal}_{P. formosa} / \text{Kanal}_{G. gallus} \times 2.5 \text{ pg/Nukleus}$$

Da es sich bei DAPI um einen AT-spezifischen Farbstoff handelt, benötigt man einen Standard, der einen ähnlichen AT / GC-Gehalt aufweist. Der interne Standard *Gallus gallus* eignet sich bei dieser Zielsetzung besonders, da erstens der AT-

Gehalt von 57.73% dem durchschnittlichen AT-Gehalt von Knochenfischen ($59.32 \pm 2.18\%$) und besonders der Gattung *Poecilia* (*P. reticulata* 58.87%) (Vinogradov, 1998) sehr ähnlich ist. Weiterhin eignet sich *Gallus gallus* als Standard, weil der DNA-Gehalt von 2.5 pg/Nukleus (Vinogradov, 1998) dem von *P. formosa* näher ist als z.B. menschliche Leukozyten (7.0 pg/Nukleus), die ebenfalls vielfach als Standard verwendet werden (Vindelov et al., 1983). Drittens hat es sich meßtechnisch als äußerst günstig herausgestellt, daß diploide *P. formosa*-Zellen links vom Standardpeak (Abbildung 25A) erscheinen, die Zellen triploider Tiere jedoch rechts davon (Abbildung 25B).

Für diploide *P. formosa* ergibt sich somit ein DNA-Gehalt von 1.94 ± 0.06 pg/Nukleus (N = 15), für triploide von 3.10 ± 0.05 pg/Nukleus (N = 10). Dieser Wert entspricht in etwa dem 1.5 fachen des diploiden Wertes.

Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse konnten mit Hilfe von Chromosomenpräparationen bestätigt werden: Die 15 Fische, die mit Hilfe der Durchflußzytometrie als diploid identifiziert wurden, zeigten 46 akrozentrische Chromosomen (Abbildung 25C), die zehn als triploid identifizierte Tiere wiesen 69 akrozentrische Chromosomen auf (Abbildung 25D).

Somit konnte eine einfache und wenig zeitaufwendige Methode etabliert werden, die es ermöglicht, eine große Anzahl an Fischen minimal-invasiv auf ihren Ploidiegrad hin zu untersuchen (Lamatsch et al., 2000b). Durch das Fehlen der Rückenflosse waren die Tiere nicht in ihrem Schwimmverhalten behindert, und kein einziger Fisch starb infolge des Eingriffes.

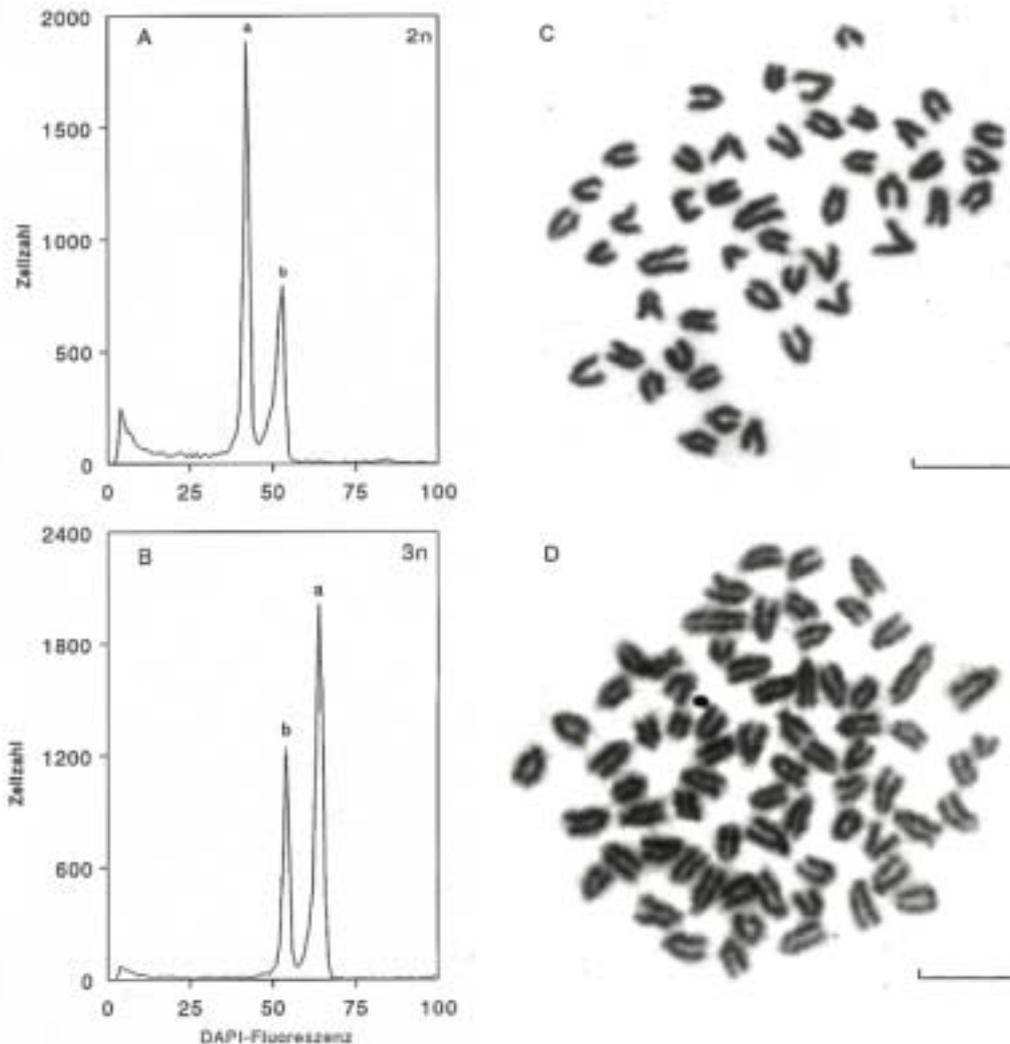


Abbildung 25: Durchflußzytometrisches Histogramm (A) eines diploiden und (B) eines triploiden *P. formosa*. Peak a stellt die Zellen der dorsalen Rückenflosse von *P. formosa* dar, Peak b die Erythrozyten von *G. gallus*. Der nukleäre DNA-Gehalt ist proportional zu der Fluoreszenzintensität, die im Histogramm bestimmten Kanälen zugeordnet wird. (C) und (D) sind die jeweils zugehörigen Metaphasen eines diploiden *P. formosa* mit $2n = 46$ Chromosomen (C) und eines triploiden *P. formosa* mit $3n = 69$ Chromosomen (D). Der Balken entspricht $5\mu\text{m}$.

4.3.3 Durchflußzytometrische Analyse von Individuen aus natürlichen Populationen

Unter Verwendung der oben genannten Methode wurden unter den 49 nach Würzburg importierten Individuen von den Fundorten 28/96 und 29/96 drei triploide (#6, #28, #41) detektiert (Abbildung 26). Dies entspricht einer Häufigkeit von 6.12 %. Der durchschnittliche nukleäre DNA-Gehalt der diploiden Tiere betrug 1.92 ± 0.07 pg/Nukleus bei einer Standardabweichung der Messung von 2.96 ± 1.05 %

($CV\% = SD/MN$). An dem CV-Wert kann man die Qualität der Messungen ablesen: Je kleiner der Wert, desto geringer die Streuung und desto besser die Messung. Die drei identifizierten Triploiden hatten einen durchschnittlichen DNA-Wert von 2.96 ± 0.05 pg/Nukleus (CV% von 2.52 ± 0.66), was dem erwarteten 1.5-fachen des diploiden Wertes entspricht.

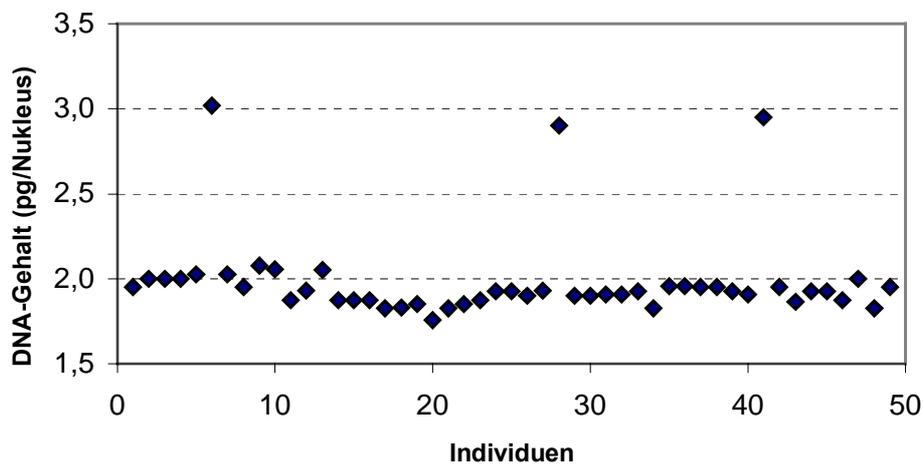


Abbildung 26: Durchflußzytometrische Meßwerte der 49 Wildfänge von Fundort 28/96. Der durchschnittliche DNA-Gehalt der diploiden Tiere betrug 1.92 ± 0.07 pg/Nukleus, die drei triploiden Individuen wiesen einen durchschnittlichen DNA-Gehalt von 2.96 ± 0.05 pg/Nukleus auf. Dies entspricht dem erwarteten 1.5-fachen des diploiden Wertes.

Während Individuum # 41 keine Nachkommen produzierte, gingen aus den Verpaarungen der beiden triploiden Weibchen # 6 und # 28 mit Black Molly-Männchen 13 bzw. 15 Töchter hervor, deren Ploidiegrad ebenfalls untersucht wurde (Tabelle 3). Diese wurden wiederum mit Black Molly angepaart, so daß mehrere Generationen hinsichtlich Fertilität und paternaler Introgression analysiert werden konnten. Es zeigte sich, daß triploide Wildfänge und ihre Nachkommen fertil sind und ihr triploides Erbgut ohne eine weitere Erhöhung des Ploidiegrades klonal vererben. Die Nachkommen von # 6 zeigten im Mittel einen DNA-Wert von 3.06 ± 0.09 pg/Nukleus ($CV\% 1.97 \pm 0.59$, $N = 42$), die Nachkommen von # 28 wiesen 2.96 ± 0.06 pg/Nukleus ($CV\% 2.37 \pm 0.69$, $N = 31$) auf.

Tabelle 3: DNA-Gehalt der beiden fertilen triploiden Wildfänge #6 und #28 sowie deren Nachkommen in erster, zweiter und dritter Generation.

Weibchen	DNA-Gehalt [pg]	CV% <i>P.f.</i>	Weibchen	DNA-Gehalt [pg]	CV% <i>P.f.</i>
6	3.02	3.08	28	2.90	1.89

Tochter	DNA-Gehalt [pg]	CV% <i>P.f.</i>	Tochter	DNA-Gehalt [pg]	CV% <i>P.f.</i>
6 a	3.03	2.04	28 a	3.10	1.61
6 b	2.93	3.26	28 b	2.83	2.00
6 c	2.95	2.27	28 c	2.93	2.13
6 d	3.00	1.13	28 d	3.00	2.13
6 e	2.80	2.27	28 e	2.88	2.22
6 f	2.88	3.41	28 f	2.80	2.22
6 g	2.90	1.00	Ø 28	2.90 ± 0.07	2.05 ± 0.21
6 h	2.90	2.04			
6 i	2.93	2.17			
6 j	2.95	2.27			
6 k	3.00	2.50			
6 l	2.95	2.56			
6 m	2.93	2.22			
Ø 6	2.93 ± 0.06	2.24 ± 0.65			

Enkel	DNA-Gehalt [pg]	CV% <i>P.f.</i>	Enkel	DNA-Gehalt [pg]	CV% <i>P.f.</i>
6.1	3.13	1.67	28.1	3.00	1.69
6.2	3.10	1.61	28.2	3.00	1.69
6.3	3.15	1.59	28.3	3.00	2.59
6.4	3.15	1.59	28.4	2.95	2.54
6.5	3.05	1.69	28.5	2.93	2.50
6.6	3.03	1.61	28.6	3.00	1.69
6.7	3.10	2.46	28.7	2.90	2.59
6.8	3.15	1.61	28.8	2.90	1.79
6.9	3.08	2.42	28.9	3.05	2.54
6.10	3.05	2.46	28.10	2.98	2.46
6.11	3.15	2.42	28.11	2.95	2.54
6.12	3.15	0.81	28.12	3.00	5.17
6.13	3.15	1.61	28.13	2.88	1.69
6.14	3.15	1.61	28.14	2.98	2.46
6.15	3.10	2.5	28.15	2.90	1.75
Ø 6	3.11 ± 0.04	1.84 ± 0.47	Ø 6	2.96 ± 0.05	2.38 ± 0.84

Urenkel	DNA-Gehalt [pg]	CV% <i>P.f.</i>	Urenkel	DNA-Gehalt [pg]	CV% <i>P.f.</i>
6-1	3.15	1.61	28-1	3.00	2.50
6-2	3.13	2.38	28-2	3.00	2.54
6-3	3.08	2.38	28-3	3.03	2.42
6-4	3.15	1.61	28-4	3.00	2.50
6-5	3.08	1.59	28-5	2.95	2.59
6-6	3.13	0.81	28-6	3.05	2.46
6-7	3.10	1.64	28-7	2.98	2.46
6-8	3.23	1.64	28-8	3.05	2.46
6-9	3.08	1.59	28-9	3.05	1.67
6-10	3.10	1.64	28-10	2.95	3.93
6-11	3.10	2.42	Ø 28	3.01 ± 0.04	2.55 ± 0.52
6-12	3.10	1.61			
6-13	3.08	2.59			
6-14	3.15	2.42			
Ø 6	3.12 ± 0.04	1.85 ± 0.48			

4.3.4 Anpassen der Methode an Probenentnahme im Freiland

Da immer nur eine begrenzte Anzahl an Tieren aus dem natürlichen Habitat entnommen und ins Labor gebracht werden kann, ermöglicht die direkte Probenentnahme im Freiland, eine größere Anzahl an Tieren zu analysieren. Deshalb wurde die Methode durch eine Modifikation „freilandtauglich“ gemacht: Anstatt die Flossenproben in Citrat/Tween zu zerkleinern und anschließend die Einzelzell-suspension zu fixieren, wozu eine Zentrifuge notwendig wäre, werden die entnommenen Rückenflossen direkt in kaltem 70 % Ethanol fixiert. Nachdem das Material komplett fixiert (4-6 Wochen) ist, wird das Flossengewebe in Citrat/Tween zerkleinert, nach 20 minütigem Schütteln durch Zentrifugation gesammelt und anschließend direkt gefärbt (Pepsin/DAPI). Die Qualität der Messungen war vergleichbar mit der von frisch präpariertem Flossenmaterial: Sogar nach bis zu 19 Monaten Lagerung in Alkohol konnten verlässliche Resultate bei *P. formosa* erzielt werden (2.03 pg/Nukleus, CV% 1.88, N = 1).

4.3.5 Durchflußzytometrische Analysen von Flossenmaterial aus natürlichen Populationen

Zur Messung des Ploidiegrads mit der oben genannten Methode wurden im März 1998 am Río Purificación (F.O. 28/98) 180 Flossenproben von Individuen aus verschiedenen Resttümpeln sowie dem verbleibenden Hauptfluß genommen (Abbildung 27). Von diesen 180 Flossenbiopsien konnten 28 als triploid identifiziert werden (15.56%). Die Verteilung von Tieren verschiedener Ploidiegrade variierte in den Resttümpeln jedoch stark: Bei A (Hauptfluß) waren 2 von 30 Tieren triploid (6.67 %), in Pool B 3 von 50 (6.0 %), bei C (Hauptfluß) waren 11 von 36 Tieren triploid (30.56 %), in Pool D keines von 4 Tieren (0 %) und in Pool E waren 12 von 60 Tieren triploid (20 %).

Im März 1999 (F.O. 28/99) war der Hauptfluß an mehreren Stellen völlig unterbrochen, so daß es kein fließendes Gewässer mehr gab (Abbildung 28). Eine vergleichbare Situation wurde von Balsano et al. (1989) nur einmal während 22 Forschungsreisen vorgefunden.

Von insgesamt 119 Flossenproben stellten sich nur 5 als triploid heraus (4.2 %): Bei A war 1 von 19 Tieren triploid (5.26 %), südlich von C (A´) war ebenfalls nur 1 von 19 Tieren triploid, in Pool B wies nur 1 unter 51 Tieren drei Chromosomensätze auf

(1.96%), nördlich von C (C') konnten nur 3 *P. formosa*-Weibchen gefangen werden, von denen keines triploid war. Auch von den 15 in Pool E gefangenen Individuen war keines triploid. In F und G, neu entstandene Resttümpeln im Vergleich zu 1998, konnten nur wenige *P. formosa* gefangen werden (je 2), darunter jedoch keine Triploiden. Allein im Resttümpel H befanden sich unter 8 *P. formosa* 2 Triploide (25 %).

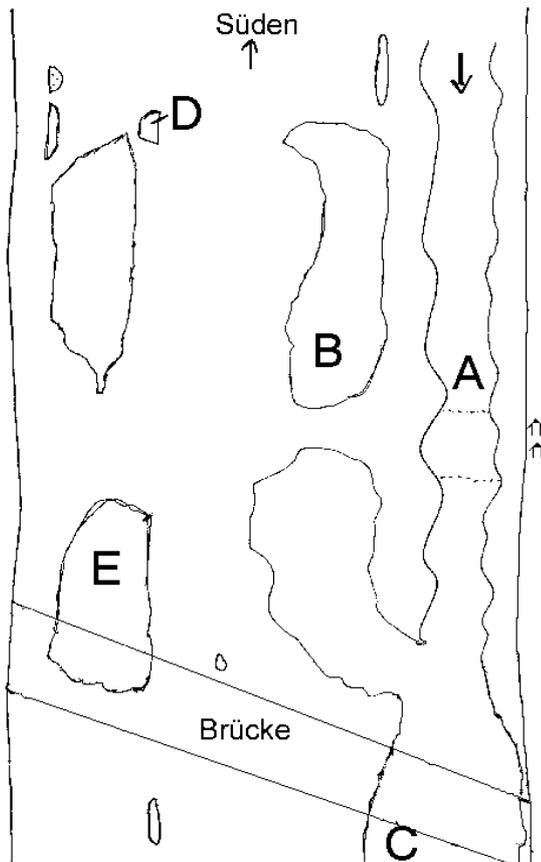


Abbildung 27: Flussbett des Río Purificación (F.O. 28) zur Trockenzeit im März 1998. A und C stellen Fangplätze im verbleibenden Hauptfluß dar. B, C und D bezeichnen Resttümpel, die vollkommen vom Hauptfluß abgetrennt waren.



Abbildung 28: Flussbett des Río Purificación (F.O. 28) zur Trockenzeit im März 1999. Die Buchstaben markieren die Fangplätze in den verschiedenen Resttümpeln.

Tabelle 4: Darstellung der Anzahl der gefangenen *P. formosa* an F.O. 28 und dem Anteil an Triploiden pro Restwasserkörper.

Pool	1998			1999		
	Anzahl	davon 3n	%	Anzahl	davon 3n	%
A	30	2	6.67	19	1	5.26
A'	-	-	-	19	1	5.26
B	50	3	6.0	51	1	1.96
C	36	11	30.6	-	-	-
C'	-	-	-	3	0	0
D	4	0	0	-	-	-
E	60	12	20	15	0	0
F	-	-	-	2	0	0
G	-	-	-	2	0	0
H	-	-	-	8	2	25
Σ	180	28	15.56	119	5	4.2

1998 wurden 39 Jungtiere aus dem Río Purificación ins Aquarium nach Würzburg gebracht. Unter 20 Tieren von F.O. 28/98 befanden sich 3 Triploide, was die Häufigkeit nicht veränderte ($31/200 = 15.5\%$). Von F.O. 29/98 wurde 1 von 19 Tieren als triploid detektiert (5.3%).

Zwei der vier Triploiden (Weibchen #376 und #377) konnten erfolgreich mit Black Molly-Männchen verpaart werden. Auch deren Nachkommen waren in erster und zweiter Generation triploid (# 376: 3.06 ± 0.04 pg/Nukleus, CV% 2.17 ± 0.567 , N = 15; # 377: 3.12 ± 0.04 pg/Nukleus, CV% 3.35 ± 0.77 , N = 5). Zusätzlich wurden 12 Tiere vom F.O. 21 nach Würzburg überführt, unter denen sich kein einziges triploides befand.

4.3.6 Identifizierung eines Mosaiktieres

Unter den 19 Individuen von F.O. 29/98 befand sich auch ein Mosaiktier, das gleichzeitig diploide und triploide Somazellen aufwies. In sukzessiven Messungen der regenerierten Rückenflosse desselben Tieres über einen Zeitraum von 9 Monaten, nahm der Anteil triploider Zellen ab (Abbildung 29).

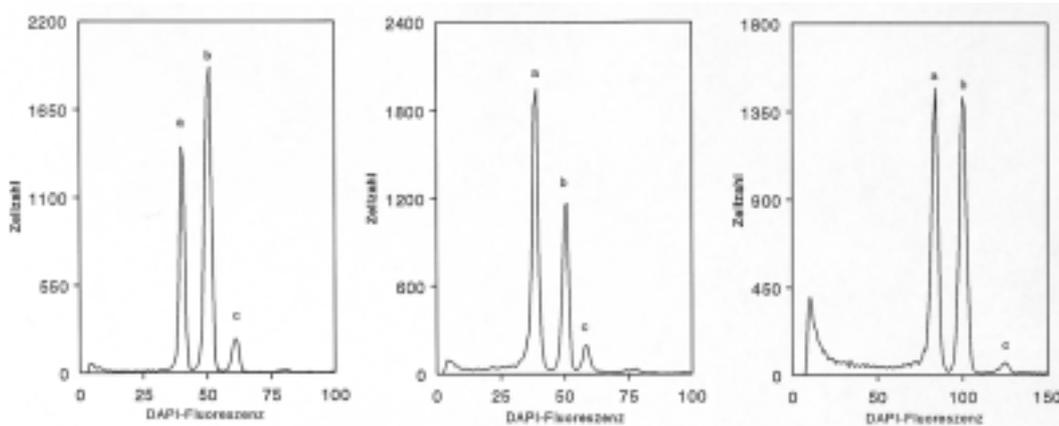


Abbildung 29: Sukzessive Messungen von Rückenflossenmaterial des selben Tieres. 1. Messung, September 1998: 16.4 % triploide Zellen, 2. Messung, Februar 1999: 10.9 % triploide Zellen, 3. Messung Juni 1999: 6.8 % triploide Zellen. Peak a = diploide Zellen von *P. formosa*, b = Erythrozyten von *Gallus gallus*, c = triploide Zellen von *P. formosa*.

Um nachzuprüfen, ob dieses Tier auch in seiner Keimbahn sowohl diploide als auch triploide Zellen hatte, wurde es mit Black Molly angepaart, und die Nachkommen durchflußzytometrisch vermessen. Alle 20 Nachkommen wiesen allerdings ausschließlich diploide Zellen auf (2.02 ± 0.03 , CV% 2.24 ± 0.61), was darauf schließen läßt, daß das Mosaik auf die Somazellen beschränkt war.

4.3.7 Untersuchung der Nachkommenzahl diploider und triploider Wildfänge

Unmittelbar nach Ankunft im Labor gebaren einige der 20 Wildfänge von F.O. 28/98 Junge in das selbe Aquarium. Interessanterweise befanden sich unter den Nachkommen ein übermäßig hoher Prozentsatz an triploiden Tieren: Obwohl nur 3 der 20 Wildfänge als triploid charakterisiert wurden, waren etwa die Hälfte der Nachkommen triploid (28 von 59 Tieren).

Unter den ersten Messungen befanden sich deutlich mehr Triploide, gegen Ende der Analysen überwogen die Diploiden (Abbildung 30). Da zuerst die größeren Individuen vermessen wurden, wurde vermutet, daß triploide Tiere im gleichen Alter evtl. größer sein könnten, also eine höhere Wachstumsrate zeigten.

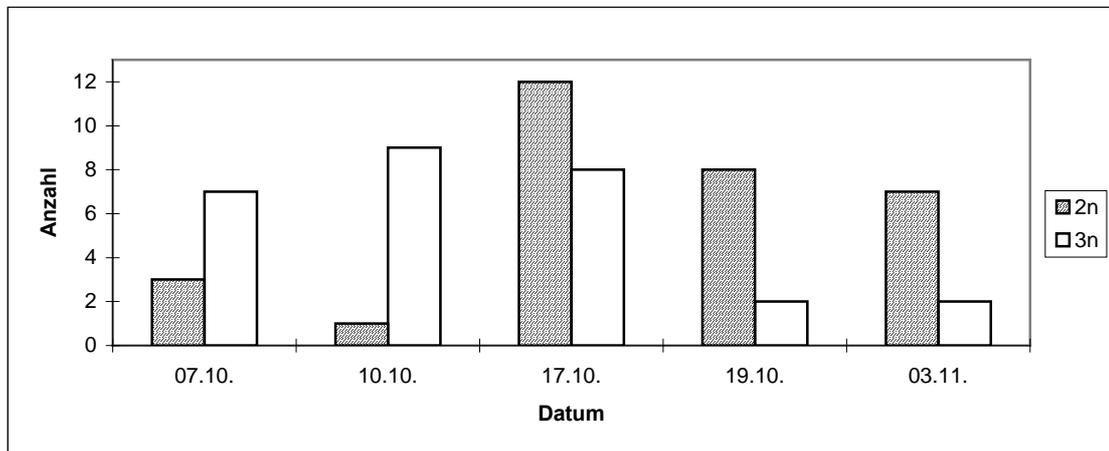


Abbildung 30: Verhältnis von diploiden (2n) und triploiden (3n) Tieren an unterschiedlichen Meßtagen.

4.3.8 Vergleichende Größenmessungen diploider und triploider Jungtiere

Die Größenmessung (Standardlänge SL, Rumpftiefe RT, Breite der Schwanzwurzel SW) der Nachkommen ($N_{\text{diploid}}=30$, $N_{\text{triploid}}=27$) ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen diploiden und triploiden Tieren. Die Standardlänge betrug bei den diploiden Individuen 25.24 ± 2.92 mm. Im Vergleich dazu betrug die Standardlänge bei triploiden 26.65 ± 1.54 mm. Dieser Unterschied zeigt einen leichten Trend, ist jedoch nicht signifikant ($p_{\text{SL}}=0.075$, Mann-Whitney U, Abbildung 31). Auch bei der Breite der Schwanzwurzel zeigten die Triploiden im Mittel nur geringfügig höhere Werte (3.98 ± 0.32 mm) als die diploiden (3.90 ± 0.49 mm, $p_{\text{SW}}=0.453$, Abbildung 33). Bei dem Vergleich der Rumpftiefe stellte sich heraus, daß die triploiden im Schnitt etwas geringere Werte aufwiesen (6.78 ± 0.52) als die diploiden (7.11 ± 0.95 , $p_{\text{RT}}=0.274$, Abbildung 32).

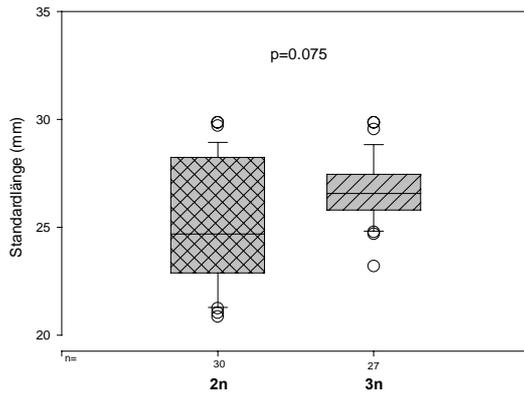


Abbildung 31: Vergleich der Standardlänge von diploiden und triploiden Nachkommen der Wildfänge von F.O. 28/98. Die Boxplots geben den Median, das obere und untere Quartil, sowie die 10 %- und 90 %-Wahrscheinlichkeitsbereiche der Daten an. Die Kreise geben die Extrema an.

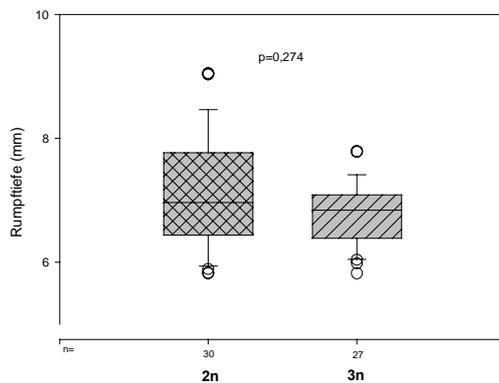


Abbildung 32: Vergleich der Rumpftiefen von diploiden und triploiden Nachkommen der Wildfänge von F.O. 28/98.

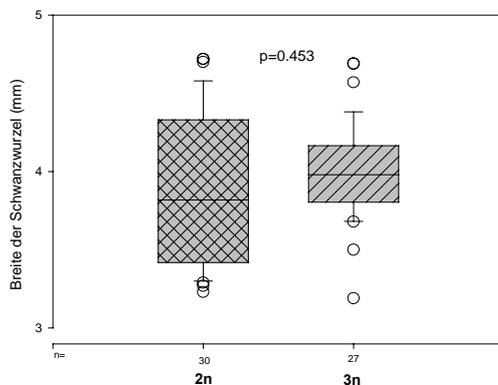


Abbildung 33: Vergleich der Breite der Schwanzwurzeln von diploiden und triploiden Nachkommen der Wildfänge von F.O. 28/98.

4.3.9 Analyse der klonalen Variabilität

Die DNA-Fingerprint Analysen ergaben, daß die triploiden *P. formosa*, die alle aus dem gleichen Flußsystem stammen, mindestens 5 bis 6 verschiedenen Klonen zugeordnet werden können (Abbildung 34 und Abbildung 35).

Aus den beiden Hybridisierungen ging hervor, daß Tier 5 einen eigenen Klon repräsentiert (A), Individuum 7 und 10 einem weiteren Klon (B) angehören und Klon C von Individuum 8, 9, und 11 gebildet wird. Individuum 12 könnte man trotz schlechter Qualität aufgrund einer zu geringen DNA-Menge als weiteren Klon ansehen (D). Individuum 13 bildet einen anderen Klon (E), der evtl. durch Addition des Mikrochromosoms und klonale Variabilität aus Klon C hervorgegangen sein könnte. Die klonale Zugehörigkeit von Individuum 6 konnte aufgrund einer zu geringen DNA-Menge im Gel nicht bestimmt werden. Allerdings ergab eine frühere Analyse von drei der obengenannten triploiden Individuen (6, 7, 8) sowie eines weiteren triploiden *P. formosa* (19), dessen genomische DNA-Menge nicht ausreichte, um es erneut zu analysieren, daß Individuum 6 Klon B zuzuordnen ist (Abbildung 36 und Abbildung 37). Das zusätzliche Tier 19 ist Klon C sehr ähnlich, weist jedoch im Vergleich zu Individuum 8 eine zusätzliche Bande knapp unterhalb von 21 kb auf (Abbildung 36). Ordnete man dieses Tier deshalb einem eigenen Klon zu, so erhöhte sich die Zahl der triploiden Klone auf 6. Individuum 1* stellt eine Kontrolle dar, anhand derer alle Gele untereinander verglichen werden können.

Aus der Analyse der DNA-Fingerprint Muster geht hervor, daß die 7 diploiden *P. formosa* nur 2 bis 3 Klone darstellen, wobei Individuum 16 nicht eindeutig zu interpretieren ist. Die 9 triploiden *P. formosa* hingegen können 5 bis 6 Klonen zugeordnet werden.

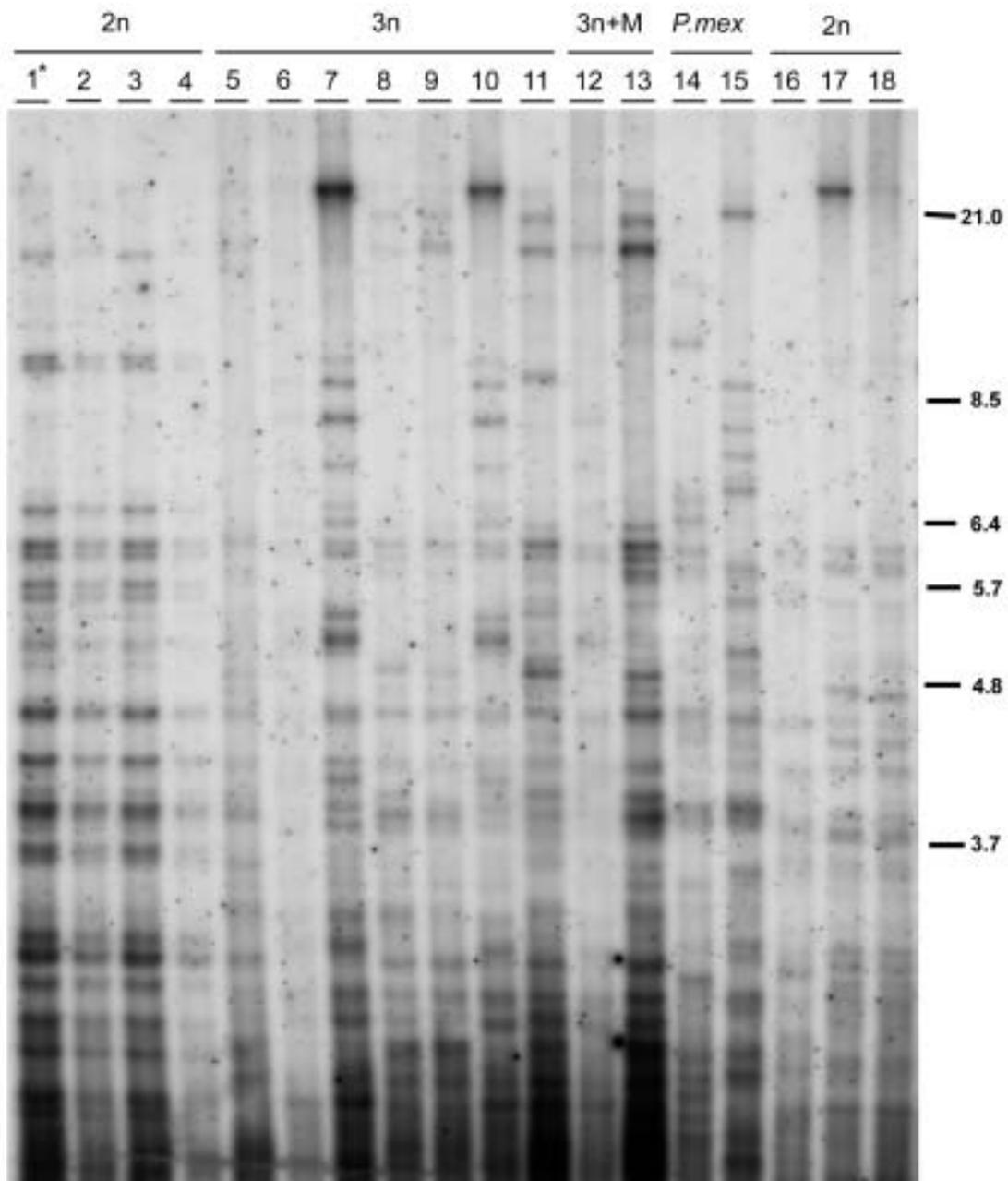


Abbildung 34: Multilocus DNA-Fingerprint von *P. formosa*-Wildfängen der Fundorte 28 und 29, hybridisiert mit dem Oligonukleotid (GA)₈. Bei den Tieren 1 bis 3 handelt es sich um diploide Individuen von F.O. 28 aus dem Jahr 1996 (28/96), Individuum 4 stammt von 29/96. 5 bis 11 stellen triploide Wildfänge aus den Jahren '96 und '98 dar. 12 und 13 stammen von 28/96 und weisen neben drei Chromosomensätzen ein zusätzliches Mikrochromosom auf. Tier 14 ist ein *P. mexicana*-Männchen, 15 ein *P. mexicana*-Weibchen. 16 bis 18 sind nochmals diploide Tiere von 28/98. 1* stellt ein Individuum dar, daß in allen Gelen verwendet wird, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

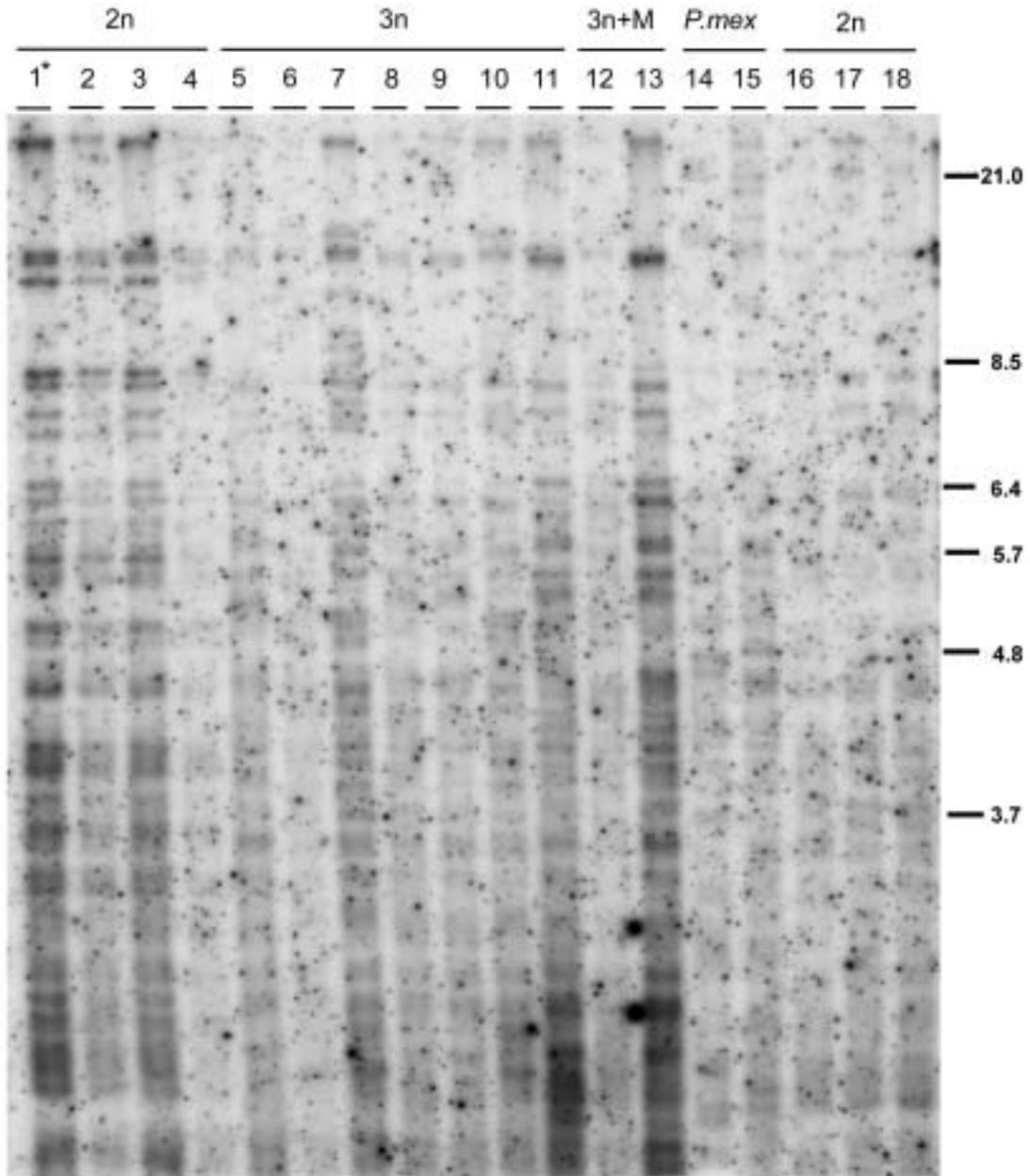


Abbildung 35: Multilocus DNA-Fingerprint von *P. formosa*-Wildfängen der Fundorte 28 und 29, hybridisiert mit dem Oligonukleotid (GGAT)₄. Bei den Tieren 1 bis 3 handelt es sich um diploide Individuen von F.O. 28 aus dem Jahr 1996 (28/96), Individuum 4 stammt von 29/96. 5 bis 11 stellen triploide Wildfänge aus den Jahren '96 und '98 dar. 12 und 13 stammen von 28/96 und weisen neben drei Chromosomensätzen ein zusätzliches Mikrochromosom auf. Tier 14 ist ein *P. mexicana*-Männchen, 15 ein *P. mexicana*-Weibchen. 16 bis 18 sind nochmals diploide Tiere von 28/98. 1* stellt ein Individuum dar, daß in allen Gelen verwendet wird, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

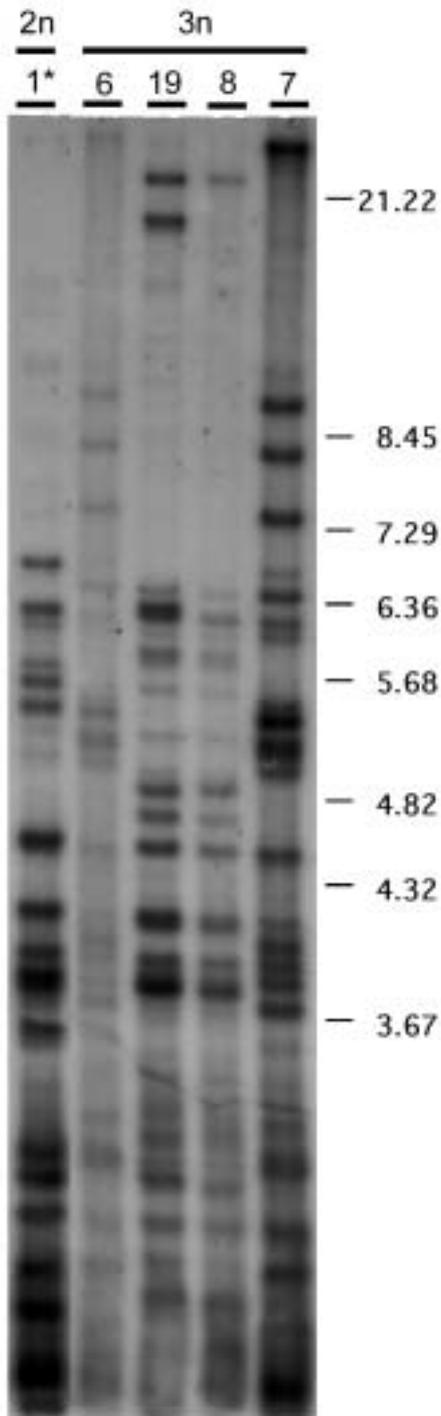


Abbildung 36: Multilocus DNA-Fingerprint von triploiden *P. formosa*-Wildfängen von Fundort 28/96, hybridisiert mit dem Oligonukleotid $(CA)_8$. 1* stellt das Vergleichstier zu den anderen Gelen dar.

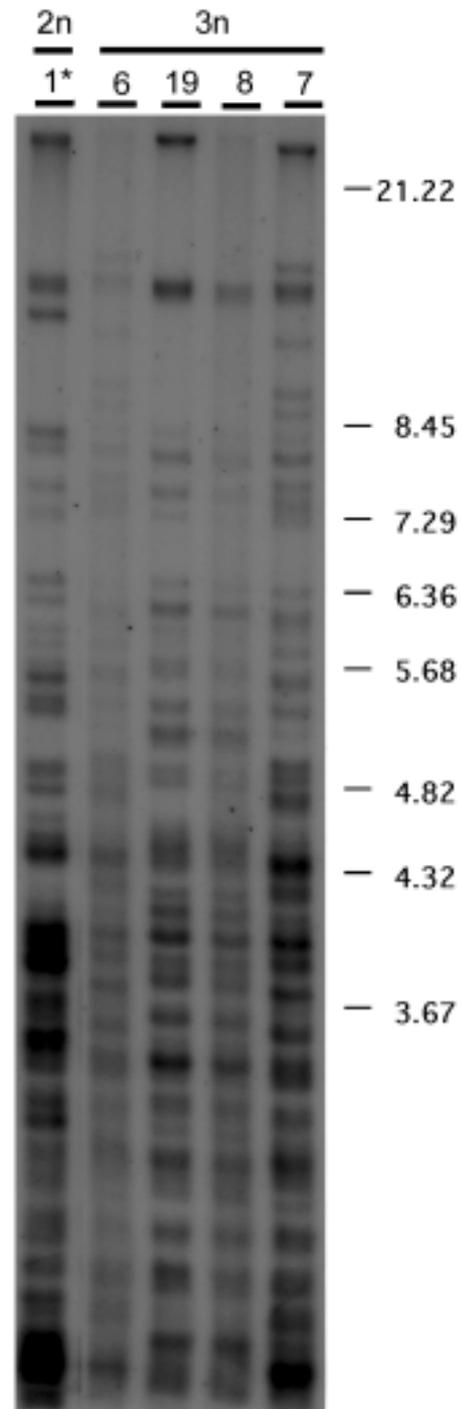


Abbildung 37: Multilocus DNA-Fingerprint von triploiden *P. formosa*-Wildfängen von Fundort 28/96, hybridisiert mit dem Oligonukleotid $(GGAT)_4$. 1* stellt das Vergleichstier zu den anderen Gelen dar.

4.4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche evolutive Bedeutung das Auftreten polyploider *P. formosa* in dem sonst überwiegend diploiden Fortpflanzungskomplex hat. Dazu wurde die Häufigkeit triploider Individuen mit Hilfe einer eigens dazu entwickelten minimal-invasiven Methode ermittelt. Außerdem sollte untersucht werden, welchen Einfluß paternale Introgression auf die klonale Variabilität bei *P. formosa* hat. Dazu wurden chromosomale Klone anhand der Karyotypen bestimmt und mit Hilfe von Multilocus DNA-Fingerprints molekularen Klonen zugeordnet.

4.4.1 Etablierung einer effizienten Screening-Methode

Die Messung des DNA-Gehaltes an Flossenbiopsien mittels der Durchflußzytometrie erlaubt die schnelle, einfache und akkurate Bestimmung des Ploidiegrades von *P. formosa*. Damit ist es möglich, triploide Individuen zu identifizieren und durch Verwendung in Zuchtexperimenten, Verhaltensexperimenten oder bei Gewebetransplantationen wichtige Aufschlüsse über ihre biologische Signifikanz und evolutive Bedeutung zu gewinnen. Durch die Eignung der Feldmethode kann Einblick in natürliche Populationen gewonnen werden, ohne die Tiere dauerhaft aus ihrem Habitat zu entfernen.

Es konnte gezeigt werden, daß die hier etablierte Methode sich nicht nur für *P. formosa* eignet, sondern auch bei 13 weiteren Arten verlässliche DNA-Werte ergibt, die mit vorliegenden Werten aus der Literatur übereinstimmen (Lamatsch et al., 2000b).

4.4.2 Häufigkeit diploider und triploider *P. formosa* in natürlichen Populationen

Mit Hilfe der entwickelten minimal-invasiven Meßmethode konnte die Häufigkeit triploider *P. formosa* in natürlichen Populationen in den Jahren 1996, 1998 und 1999 untersucht werden. Bereits früher beobachtete starke Schwankungen ihres Anteils an der Gesamtpopulation (Rasch & Balsano, 1974; Balsano et al., 1981; Balsano et al., 1972; Turner, 1982; Rasch & Balsano, 1973; Prehn & Rasch, 1969) konnten bestätigt werden: Im Jahr 1996 waren 6.12 % der untersuchten *P. formosa* an F.O. 28 triploid, im Jahre 1998 15.5 % und 1999 waren es 4.2 %. Diese Werte liegen

damit allerdings im Mittel unter denen von Balsano et al. (1972), die von 1965 bis 1968 am F.O. 28 19.5 % bis 78.4 % (durchschnittlich 54.0 %) als triploid identifiziert haben. Auch konnten Werte von über 90 % in einzelnen Restwasserbecken wie bei Balsano et al. (1972) nicht gefunden werden. Die niedrigeren Werte könnten auf die starken saisonalen Unterschiede zurückzuführen sein (Balsano et al., 1983), die bei über ganze Jahre gemittelte Werte nicht zum Tragen kommen.

Weder im Freiland noch im Labor konnten jemals tetraploide *P. formosa* detektiert werden. Da es keine augenfälligen Einwände gegenüber einer weiteren Erhöhung des Ploidiegrades auf z.B. vier Chromosomensätze gibt, ist unklar, warum weder in natürlichen Populationen noch unter den Nachkommen triploider Freilandfänge jemals tetraploide Individuen identifiziert werden konnten. Es könnte sein, daß in sehr seltenen Fällen tetraploide *P. formosa* entstehen, die aber bislang alle steril sind und deshalb als Einzelereignisse nicht detektiert werden können. Die Entstehung neuer fertiler Klone scheint demnach ein äußerst seltenes Ereignis zu sein. Entsprechend könnte evtl. auch die Entstehung von diploiden und triploiden *P. formosa* auf ein einziges erfolgreiches Entstehungsereignis zurückgeführt werden

Am Fundort 21 konnten keine triploiden Individuen festgestellt werden. Diese Tatsache unterstützt die Ergebnisse von Balsano et al. (1989), daß es außerhalb des Río Soto la Marina-Flußsystems kaum Fundorte gibt, an denen Triploide zu finden sind. Ob dies allerdings an der Tatsache liegt, daß *P. formosa* im Río Soto la Marina-Flußsystem ausschließlich mit der Unterart *P. mexicana limantouri* sympatrisch vorkommt, wie die Autoren vermuten, bedarf näherer Untersuchungen.

Unterschiede zwischen den Habitaten des Río Purificación wurden nicht untersucht, da im Rahmen dieser Arbeit überwiegend Fundorte aufgesucht wurden, an denen in früheren Arbeiten bereits von einem hohen Anteil asexueller Weibchen sowie triploider *P. formosa* berichtet wurde. Balsano et al. (1989) fanden bei F.O. 28 und 29 durchschnittlich etwa 50 % asexuelle Weibchen. Döbler (1998) fand 1998 am F.O. 28 (MIII/9) 34.9% (09.03.98) bzw. 27 % (10.03.98) asexuelle Weibchen, wobei die Verteilung innerhalb der einzelnen Fundstellen (A-E) stark schwankte: A 31.6% bzw. 50%, B 88.6 % bzw. 100%, C 48.5 % bzw. 42.9 %, D 12.5 % bzw. 13.2 %, E 18.7 % bzw. 22.4%. Die Anzahl der *P. mexicana*-Männchen lag durchschnittlich bei 9.8 % pro Fundstelle.

Eine Erklärung für die großen Häufigkeitsunterschiede in den Restwasserpools wäre, daß, während sich der Fluß durch die Trockenzeit langsam zurückbildet, diploide und triploide (sowie *P. mexicana*) zufällig auf die Restwasserbecken verteilt

werden. In dieser extremen Situation (schwindende Wasserkörper mit dem damit verbundenen Verlust der Habitatdiversität und Möglichkeit der Einnischung, hohe Individuendichte, hohe Temperaturen, geringe Sauerstoff-Werte) könnten sich geringe Unterschiede in der Fitneß zwischen diploiden und triploiden *P. formosa* ausprägen. Der hohe Anteil Triploider in bestimmten Restwasserbecken (Balsano et al., 1972) könnte auf eine höhere Fitneß triploider *P. formosa* unter extremen Bedingungen hinweisen.

Der übermäßig hohe Anteil an Triploiden unter den Nachkommen von ins Labor transportierten Freilandfängen legte die Vermutung nahe, daß Triploide mehr Nachkommen produzieren als Diploide. Unter der Annahme, daß jedes der importierten Weibchen Nachkommen hatte, hieße dies, daß triploide Weibchen im Schnitt 9.33 Nachkommen produzierten, während diploide nur 1.82 Nachkommen produzierten. Erhöhte Embryonenzahlen konnten jedoch von Balsano et al. (1989) nicht festgestellt werden. Im Gegenteil zeigten triploide *P. formosa*-Weibchen in den Wintermonaten sogar eine gegenüber diploiden signifikant reduzierte Anzahl an Embryonen. Über das Jahr gesehen ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr.

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedlichen Nachkommenszahlen wäre, daß bei gleichen Wurfgrößen alle drei triploiden Weibchen befruchtet waren, während nur ein Bruchteil der diploiden Weibchen befruchtet war. Eine dritte Erklärungsmöglichkeit wäre, daß einige der diploiden Weibchen durch paternale Introgression triploide Nachkommen produziert haben. Jede dieser Erklärungsversuche würde einen enormen evolutiven Vorteil triploider Individuen bedeuten. In Zusammenhang mit der ermittelten höheren Überlebensrate von Triploiden (Balsano et al., 1983) stellt sich die Frage, warum sich Triploide nicht in einem „selective sweep“ in der Population durchsetzen. Der Frage soll weiterhin nachgegangen werden.

Große Weibchen haben einen höheren reproduktiven Erfolg als kleine Weibchen. Adulte polyploide Individuen sind jedoch, bis auf einige Invertebraten, bekanntermaßen nicht größer als diploide, da sie die erhöhte Zellgröße mit einer verringerten Zellzahl kompensieren. Aus einem schnelleren Größenwachstum und der daraus resultierenden früher eintretenden Geschlechtsreife könnten jedoch vielleicht reproduktive Vorteile entstehen. Die Vermutung, daß triploide *P. formosa* ein schnelleres Größenwachstum aufweisen als diploide – im gleichen Alter also größer sind –, konnte anhand der Messungen der Standardlänge, Rumpftiefe und Breite der Schwanzwurzel aber nicht bestätigt werden.

4.4.3 Klonale Variabilität

Anhand der DNA-Fingerprints konnte nachgewiesen werden, daß die 9 triploiden Wildfänge mindestens 5-6 verschiedene Klone repräsentieren, während die 7 diploiden *P. formosa* nur 2 bis 3 verschiedenen Klonen angehören. Die analysierte Anzahl an diploiden und triploiden *P. formosa* aus natürlichen Habitaten ist zu gering, um definitive Aussagen machen zu können. Die vorliegenden Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß die Triploiden einen signifikanten Beitrag zur klonalen Diversität von *P. formosa* leisten. Turner et al. (1983) konnten anhand von Allozymdaten die untersuchten diploiden *P. formosa* 2 verschiedenen Genotypen zuordnen, die triploiden jedoch 8 verschiedenen Klonen. Triploide sind also der variabelere Teil einer asexuellen Population von *P. formosa*. Die große Heterogenität ist ein Hinweis darauf, daß triploide Klone immer wieder *de-novo* entstehen könnten. Bei *Poeciliopsis* hingegen zeigen die hybridogenetischen Diploiden eine deutlich höhere Variabilität als die gynogenetischen Triploiden, da immer wieder neue Diploide durch Hybridisierung der Elternarten entstehen (Schultz, 1977; Vrijenhoek, 1979). *P. formosa* ist wohl auf ein einziges Hybridisierungsereignis zurückzuführen (Turner, 1982). Da im Río Purificación *P. formosa* mit nur einer der Elternarten vorkommt (*P. mexicana limantouri*), kann erneute Hybridisierung als Quelle genetischer Variation bei diploiden *P. formosa* in dieser Population ausgeschlossen werden. Selbst in zahlreichen Laborversuchen gelang es bisher nicht, durch Hybridisierung die Entstehung von *P. formosa* nachzuvollziehen. Dies deutet darauf hin, daß die Entstehung diploider *P. formosa* tatsächlich ein extrem seltenes Ereignis ist und ganz besondere Voraussetzungen hinsichtlich des Genotyps der Elternarten und der Kombination von Erbanlagen in den F₁-Bastarden erfordert. Triploide *P. formosa* treten jedoch sogar unter Laborbedingungen auf, allerdings als Männchen (siehe Kapitel 5) oder sterile Weibchen. Bislang ist nicht geklärt, warum unter Laborbedingungen entstandene triploide Weibchen steril sind. Anscheinend ist auch hinsichtlich der Fertilität von Bedeutung, woher das dritte Genom stammt.

4.4.4 Mosaiktier

Unter Hunderten von analysierten *P. formosa* aus natürlichen Lebensräumen konnte ein Individuum identifiziert werden, das sowohl diploide als auch triploide somatische Zellen aufwies. Nach heutigem Wissensstand handelt es sich hierbei um das erste Individuum aus dem *P. formosa*-Komplex, das ein Mosaik aufweist.

Die Durchflußzytometrie hat sich auch hier als wertvolle Methode herausgestellt, da z.B. anhand von Chromosomenanalysen ein so geringer Anteil an triploiden Zellen wie bei dem hier beschriebenen Mosaiktier kaum zu detektieren gewesen wäre. Um Aufschlüsse über die Häufigkeit, evolutive Bedeutung und mögliche Mechanismen von Mosaikentstehung im *P. formosa*-Komplex zu erhalten, müssen jedoch erst weitere Individuen gefunden werden.

Mosaiktiere sind bereits in anderen Arten wie *Platemys platycephala* (Bickham et al., 1985; Bickham et al., 1993), *Carassius auratus langsdorfii* (Murayama et al., 1986), *Phoxinus eos-neogaeus* (Dawley & Goddard, 1988; Goddard & Schultz, 1993) und *Lacerta unisexualis* (Kupriyanova, 1989) beschrieben worden.

Die diploiden Zellen stellten bei dem *P. formosa*-Mosaiktier den Hauptanteil (mindestens 83.6 %), was auch von Dawley & Goddard (1988) bei *Phoxinus eos-neogaeus* beschrieben wurde. Interessanterweise nahm bei wiederholten Messungen nach Flossenregeneration der Anteil triploider Zellen ab. Eine solche Veränderung der relativen Zellzahlen wurde bereits von Dawley & Goddard (1988) für vier Individuen beschrieben, allerdings führten die Autoren das Ergebnis auf Veränderungen in der Meßmethodik zurück. Die Erhöhung des Anteils diploider Zellen in der Rückenflosse des *P. formosa*-Weibchens könnte darauf beruhen, daß die Zellteilung triploider Zellen aufgrund der 1.5 fachen DNA-Menge langsamer vonstatten geht als die diploider Zellen. Bei der Regeneration der Rückenflosse würde demnach der Anteil diploider Zellen steigen.

Auch die Keimbahn des Weibchens hätte ein Mosaik aufweisen können, was diploiden und triploiden Nachwuchs zur Folge gehabt hätte. Die Tatsache, daß alle 20 Nachkommen diploid waren, weist darauf hin, daß das Mosaik auf die somatischen Zellen beschränkt war. Dawley & Goddard (1988) konnten zeigen, daß zwei Individuen von *Phoxinus eos-neogaeus*, die in ihrem Schwanzflossen-Gewebe eindeutig ein Mosaik aufwiesen, ausschließlich triploide Erythrozyten besaßen. Da die Determinierung der Zellen für ein bestimmtes Gewebe erst ab der Gastrulation stattfindet (Kimmel & Warga, 1986), können entweder alle oder aber nur einzelne Gewebe von einem Mosaik betroffen sein.

Trotz der genannten Beispiele handelt es sich bei Mosaikbildung um ein seltenes Ereignis. Bogart (1980) und Schultz (1979) sehen allerdings in unisexuellen Hybriden eine potentielle Quelle für die Entstehung von Mosaiken, da aufgrund der ungewöhnlichen Fortpflanzungsmechanismen oftmals triploide Individuen produziert werden. Dawley & Goddard (1988) diskutieren zwei mögliche Entstehungs-

mechanismen für Mosaik in unisexuellen Hybridorganismen: (1) Genomverlust aus einer triploiden Blastomere oder (2) Neuentstehung einer triploiden Blastomere durch verzögerte Befruchtung.

Wenn eine tatsächlichen Befruchtung einer diploiden Oozyte durch ein haploides Spermium zu einer triploiden Zygote geführt hat, könnte ein Mosaik dadurch entstehen, daß in den sich teilenden triploiden Zellen ein ganzer Chromosomensatz verloren geht („Genomverlust“). Der Anteil diploider und triploider Zellen würde davon bestimmt, wann dieses Ereignis in der Ontogenese auftritt. Dieser Mechanismus wurde für *Lacerta* vermutet (Darevski et al., 1986).

Die zweite Möglichkeit sei „verzögerte Befruchtung“. Demnach könnte sich ein Mosaik bilden, wenn der Spermienkern, der in eine diploide Oozyte eindringt, zunächst inaktiv im Zytoplasma verbleibt, bevor es zur Karyogamie kommt. Bei *Carassius auratus langsdorfii* könnte dieser Mechanismus für die Entstehung von 3n/4n-Mosaiken verantwortlich sein (Kobayashi, 1971). Wahrscheinlich gibt es aber für diese verzögerte Befruchtung nur ein kurzes Zeitfenster nach dem Eindringen des Spermienkerns in die Oozyte: Experimentelle Arbeiten von Komar (1982) lassen vermuten, daß die Transformation eines Spermienkerns in einen männlichen Pronukleus nur eine bestimmte Zeit nach der Aktivierung der Oozyte möglich ist, da die zur Transformation nötigen Faktoren nicht länger zur Verfügung stehen (Czolowska et al., 1984).

Je früher es bei einer triploiden Oozyte zu einem Genomverlust kommt, desto höher wird der Anteil diploider Zellen sein (max. 50%). Wenn diese diploiden Zellen sich dann aufgrund ihres geringeren DNA-Gehaltes schneller vermehren als triploide, könnte es zu dem hohen Anteil an diploiden Zellen kommen. Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung gestützt, daß der Anteil der diploiden Zellen in der sich regenerierenden Rückenflosse von Messung zu Messung höher wurde. Allerdings würde eine verzögerte Befruchtung ebenfalls zu einem höheren Anteil an diploiden Zellen führen: Die Karyogamie des Spermiums mit einer Blastomere im 2-Zell-Stadium hätte 50 % diploide Zellen zur Folge, im 4-Zell-Stadium 75 % und im 8 Zell-Stadium wären es bereits 86 % diploide Zellen. Welcher Mechanismus für die Mosaikentstehung des *P. formosa*-Weibchens verantwortlich ist, kann an dieser Stelle nicht entschieden werden.

Schartl et al. (1995b) vermuteten, daß die Wirtsmännchen, die mit parasitischen *P. formosa* kopulieren, ihre Kosten dadurch senken könnten, daß sie Teile ihres

Genoms in die asexuelle Population einbringen. Dies wurde von Beukeboom et al. (1995) kritisiert: Das Einbringen von Genen in asexuelle Nachkommen stelle eine Art „Sackgasse“ dar. Eine sexuelle Art könnte nur dann einen Vorteil aus paternaler Introgression ziehen, wenn die eingebrachten Gene eines Tages in den sexuellen Genpool zurückfließen. Dafür gäbe es aber bislang keine Beweise.

Sollte sich jedoch herausstellen, daß bei dem *P. formosa*-Weibchen ein Genomverlust aus einer triploiden Oozyte die Ursache für die Mosaikbildung war, so muß angenommen werden, daß es sich um einen der „*mexicana*“-Chromosomensätze gehandelt hat, da die Nachkommen als *P. formosa* identifiziert wurden. Demnach könnten triploide *P. formosa* aber auch den Chromosomensatz verlieren, der nicht durch den Wirt bereitgestellt wird – und somit ihren Hybridcharakter. Theoretisch würde somit z.B. ein diploider gonochoristischer *P. mexicana* „restauriert“, der phänotypisch und genotypisch nicht mehr als *P. formosa* zu erkennen ist. Damit wäre das Einbringen von Genen in asexuelle *P. formosa* für den Wirt adaptiv.

4.4.5 Evolutive Bedeutung von Polyploidie

Bei der Frage nach dem Ursprung und der evolutiven Bedeutung von Polyploidie bei unisexuellen Vertebraten stößt man unumgänglich auf die starke Relation zwischen Hybridisierung, Eingeschlechtlichkeit und Polyploidie. Fast alle unisexuellen Formen, die Vrijenhoek et al. (1989) erwähnen, sind vermutlich durch ein Hybridisierungsereignis hervorgegangen und beinhalten polyploide Formen. Darunter stellt der pentaploide *Ambystoma (4) laterale-jeffersonianum* den höchsten Ploidiegrad dar.

Dabei werden immer wieder die Vor- und Nachteile von Polyploidie diskutiert. Als Vorteile werden (a) höhere Resistenz gegenüber Krankheitserregern (Pandian & Koteeswaran, 1998), (b) erhöhte Überlebensraten und schnelleres Wachstum künstlich erzeugter triploider Hybriden (Pandian & Koteeswaran, 1998), (c) sexuelle Mimikry (Beukeboom & Vrijenhoek, 1998), (d) lokale Adaptation (Beukeboom & Vrijenhoek, 1998) und (e) erhöhte genetische Variabilität (Rasch & Balsano, 1989) angeführt. Dem werden Nachteile wie (a) überwiegende Beschränkung von Polyploidie auf asexuelle Arten, die eine Art „evolutive Sackgasse“ darstellen (Schultz, 1979) und physiologische Einschränkungen aufgrund (b) eines verringerten Oberflächen/Volumen Verhältnisses der vergrößerten Zellen (Pandian

& Koteeswaran, 1998), oder (c) aufgrund verringerter Zellzahlen, wie z.B. Erythrozyten (Pandian & Koteeswaran, 1998) gegenübergestellt.

4.4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß paternale Introgression in der Natur sowohl in Form von ganzen Chromosomensätzen als auch in Form von Mikrochromosomen auftritt und fester Bestandteil des Fortpflanzungsgeschehens ist. Wie häufig neue Klone entstehen und wie groß die genetische Variabilität der Mikrochromosomen-Träger ist, bleibt noch ungeklärt. Hätten *P. formosa* mit zusätzlichen Genen einen großen Vorteil, würde man erwarten, daß sie sich sehr schnell durch „selective sweep“ in der jeweiligen Population durchsetzen. Die vorliegenden Ergebnisse sowie die bisherigen Daten (Balsano et al., 1989) zeigen dies aber nicht. Die Momentaufnahmen im Februar/März 1996, 1998 und 1999 bestätigen vielmehr die saisonalen Schwankungen.

In Zukunft ist geplant, mit der in dieser Arbeit etablierten Methode der Ploidiebestimmung die gut erforschten Habitate 28 und 29 weiterhin intensiv auf absolutes und relatives Auftreten triploider *P. formosa* zu untersuchen, um die Datenlage zu verbessern und weitere Einblicke in das Phänomen zu erhalten.

Weiterhin sollen Fundorte, an denen bisher keine triploiden *P. formosa* detektiert werden konnten, mit der o.g. Methode untersucht werden, um die Faktoren eingrenzen zu können, die paternale Introgression bei *P. formosa* auslösen. Parallel müssen die grundlegenden Mechanismen der Oozyten/Spermien-Interaktion spermienabhängiger Parthenogenoten beleuchtet werden, um verstehen zu können, warum Triploidie bei *P. formosa* ausschließlich dort vorkommt, wo die Art sympatrisch mit *P. mexicana limantouri* vorkommt. Sind *P. mexicana limantouri*-Spermien effektiver, um die Neuentstehung von Triploiden auszulösen als Spermien anderer Arten der Gattung *Poecilia*? Wie erklärt sich die Tatsache, daß triploide Wildfänge fertil sind, während solche, die im Labor entstanden sind, steril sind?

Wie asexuelle und sexuelle *Poecilia*-Weibchen (Balsano et al., 1989) könnten auch diploide und triploide *P. formosa* unterschiedliche Nischen besetzen und durch Ressourcenaufteilung die Koexistenz sichern. *P. formosa* mit einem zusätzlichen *mexicana*-Genom könnten z.B. besser an Flußbereichen mit geringerer Habitatdiversität angepaßt sein als diploide *P. formosa*. Deshalb läßt sich unter natürlichen Bedingungen schwer nachweisen, ob die allotriploide Form der diploiden

überlegen ist. In Langzeitversuchen sollen daher diploide *P. formosa* mit triploiden um identische Ressourcen konkurrieren (Nahrung, Spermien), um festzustellen, ob einer der Klone überlegen ist, wenn keine Einnischung möglich ist. Triploide könnten den diploiden aufgrund ihres zusätzlichen genetischen Materials überlegen sein oder aber aufgrund von physiologischen Einschränkungen – bedingt durch höheren DNA-Gehalt oder geringere Zellzahlen – unterlegen sein.

Zusätzlich sollen für Wildfänge die Reproduktions- und Wachstumsraten in Bezug auf den Ploidiegrad ermittelt werden.

5 Triploide männliche Tiere in einem Mikrochromosomen-tragenden Stamm von *Poecilia formosa*

5.1 Einleitung und experimentelle Fragestellung

Trotz der wahrscheinlich 100.000 Jahre währenden gynogenetischen Fortpflanzungsweise sind die Gene, die für den männlichen Phänotyp verantwortlich sind, bei *P. formosa* immer noch vorhanden und können durch Androgene angeschaltet werden. Diese Behandlung ist nur erfolgreich, wenn sie in einer sensitiven Periode nahe des Zeitpunkts der Geburt geschieht. Die so behandelten Jungfische entwickeln alle primären (Ovotestis, Spermatozeugmata) und sekundären (Körperform, Körperfärbung, Gonopodium) männlichen Geschlechtsmerkmale, wie sie auch die Männchen der gonochoristischen Elternarten aufweisen. Divergieren bestimmte Merkmale zwischen den Elternarten, so bilden die sog. „Hormonmännchen“ eine intermediäre Morphologie aus (Schartl et al., 1991). Eine unterschiedlich stark ausgeprägte „Geschlechtsumkehr“ bei *P. formosa* nach Hormonbehandlung wurde auch von Haskins et al. (1960), Hamaguchi & Egami (1980) und Turner & Steeves (1989) beobachtet.

Unter Laborbedingungen konnten aber auch spontane Vermännlichungen bei *P. formosa* beobachtet werden. Auch hier waren die Veränderungen unterschiedlich stark ausgeprägt, jedoch stets geringer als bei den Hormonmännchen: Nie bildete sich eine Hodenstruktur, und das Gonopodium war nur unvollkommen umgewandelt. Diese spontan auftretenden vermännlichten *P. formosa* werden „Pseudomännchen“ genannt (Schlupp et al., 1992).

In extrem seltenen Fällen (1:10.000) konnten phänotypische *P. formosa*-Männchen auch im Freiland beobachtet werden (Hubbs et al., 1959; Hubbs, 1964; Darnell & Abramoff, 1968; Döbler, pers. Mitteilung). Man nimmt an, daß sie das Ergebnis physiologischer oder umweltbedingter Reize (Temperatur, pH-Wert, Chemikalien) sind, welche die geschlechtliche Entwicklung bei der reinen Weibchenart *P. formosa* umkehrt.

Der vorliegende Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich im Gegensatz zu dem oben genannten mit dem spontanen Auftreten phänotypisch männlicher *P. formosa*, die in einem bestimmten Mikrochromosomen-tragenden Stamm (Schartl et al., 1995b; 1997) im Institut für Physiologische Chemie I der Universität Würzburg aufgetreten

sind. Diese acht Männchen wurden daraufhin untersucht, welche männlichen Merkmale ausgeprägt waren, und inwieweit sie sich von den Männchen der gonochoristischen Elternarten (*P. latipinna* und *P. mexicana*) sowie von Hybriden zwischen den beiden (Turner et al., 1980) unterschieden. Für den Vergleich wurden morphologische, ethologische, biochemische, zytogenetische und molekular-genetische Methoden angewandt.

5.1.1 Primäre und sekundäre Geschlechtsmerkmale

Gonopodium

Bei der Familie der *Poeciliidae* handelt es sich um ovovivipare Organismen. Demzufolge findet eine innere Befruchtung statt (Constantz, 1989), die phylogenetisch bei den Männchen die Umwandlung der Analflosse zu einem Befruchtungsorgan voraussetzte. Die als Folgewirkung männlicher Hormone über einen Zeitraum von bis zu 50 Tagen stattfindenden Veränderungen können sich an Bauch-, Brust-, Rücken- oder Schwanzflosse, der Maulregion oder dem Farbmuster der Fische zeigen. Am eindrucksvollsten sind jedoch die Auswirkungen auf die Analflosse, deren akzessorische Elemente sowie die Gonaden.

Von den neun die Analflosse bildenden Flossenstrahlen sind an der Umbildung zum Gonopodium nur die Flossenstrahlen 3, 4 und 5 beteiligt (Rosen & Bailey, 1963). Die Spitze des Gonopodiums wird ausdifferenziert, indem Anhänge (Löffel, Haken, Klauen) gebildet werden, die neben Merkmalen wie Gonopodiumslänge und -symmetrie zur Artbestimmung herangezogen werden.

Die verschiedenen Arten der Gattung *Poecilia* (Abbildung 38) besitzen ein kurzes, bilateral symmetrisches Gonopodium ohne Verdickungen und Versteifungen der distalen Segmente und ohne Zähne am Strahl 5 (Rosen & Bailey, 1963). Kurze Gonopodien (max. 33% der Standardlänge des Fisches) weisen neben einem Löffel stark ausgebildete Haken und Klauen auf (Rosen & Tucker, 1961; Chambers, 1987). Es wird vermutet, daß die starke Innervation des Löffels der taktilen Orientierung bei der Kopulation dient und das Gonopodium mit den Haken und Klauen in der Gonopore verankert wird (Chambers, 1987), um die Übertragung der Spermatozeugmata zu gewährleisten. Dabei verleihen die inneren Zähne dem Gonopodium die notwendige Stabilität bei seiner Erektion: Beim Vorwärtsschwingen des Gonopodiums werden die Flossenstrahlen 3-5 so gefaltet, daß 3 auf 5 zu liegen kommt und sich die inneren Zähne im kollagenhaltigen Bindegewebe festhaken. Auf

diese Weise entsteht vorübergehend eine Rinne, in der die Spermatozeugmata zur Gonopore gleiten (Chambers, 1987).

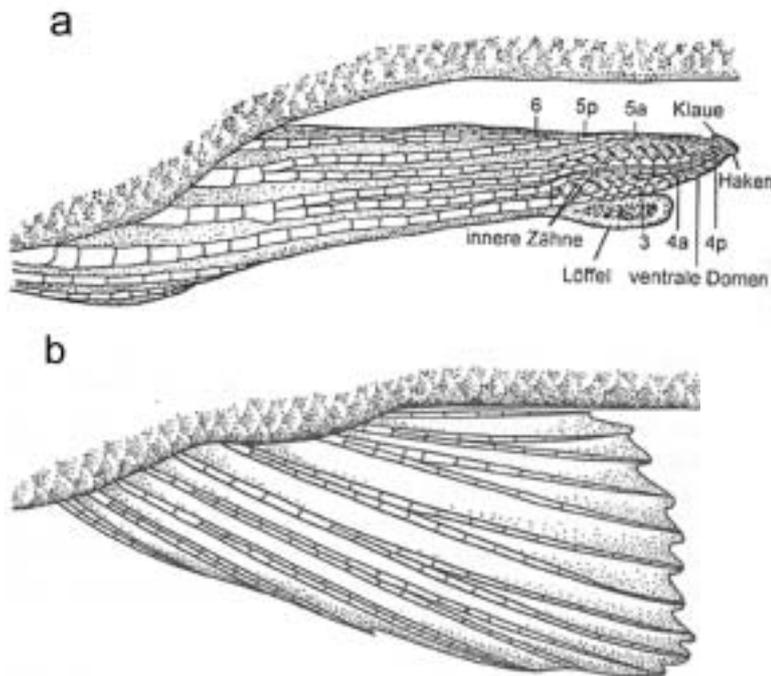


Abbildung 38: Zum Gonopodium umgebildete Analflosse (a) bei der Gattung *Poecilia* im Vergleich zu einer weiblichen Analflosse (b). Nach Döbler, 1998.

Suspensorium

Die zur Kopulation notwendigen Bewegungen des Gonopodiums können nur durch das Zusammenspiel von speziellen Knochenstrukturen (Suspensorium) mit einer stark ausgebildeten Muskulatur (*Erector analis major*, *Erector analis minor*, *Depressor analis*) in verschiedenen Winkeln zur Körperachse erfolgen (Rosen & Tucker, 1961). Dieses gonopodiale Suspensorium besteht aus drei verschiedenen knöchernen Strukturen: (1) den Gonapophysen, (2) der Interhämälplatte und (3) den Baseosten (Abbildung 39). Die Gonapophysen entstehen aus den Hämälstacheln 2 und 3 (manchmal auch 4), die stark vergrößert werden und deren unteres Ende nach vorne geneigt ist. Sie stellen die Verbindung von der Wirbelsäule zur Interhämälplatte dar. Die Interhämälplatte wiederum wird aus den Interhämälstacheln 2-4 gebildet und stellt die Verbindung zum Gonopodium über die Baseosten her. Die einzelnen Strukturen des Suspensoriums werden durch starkes Bindegewebe zusammengehalten (Constantz, 1989).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob alle oben beschriebenen Strukturen des Gonopodiums und Suspensoriums bei den *P. formosa*-Männchen ausgebildet sind und inwieweit sie sich von den Gonopodien und Suspensorien der Hybrid-Männchen bzw. *P. mexicana*-Männchen unterscheiden.

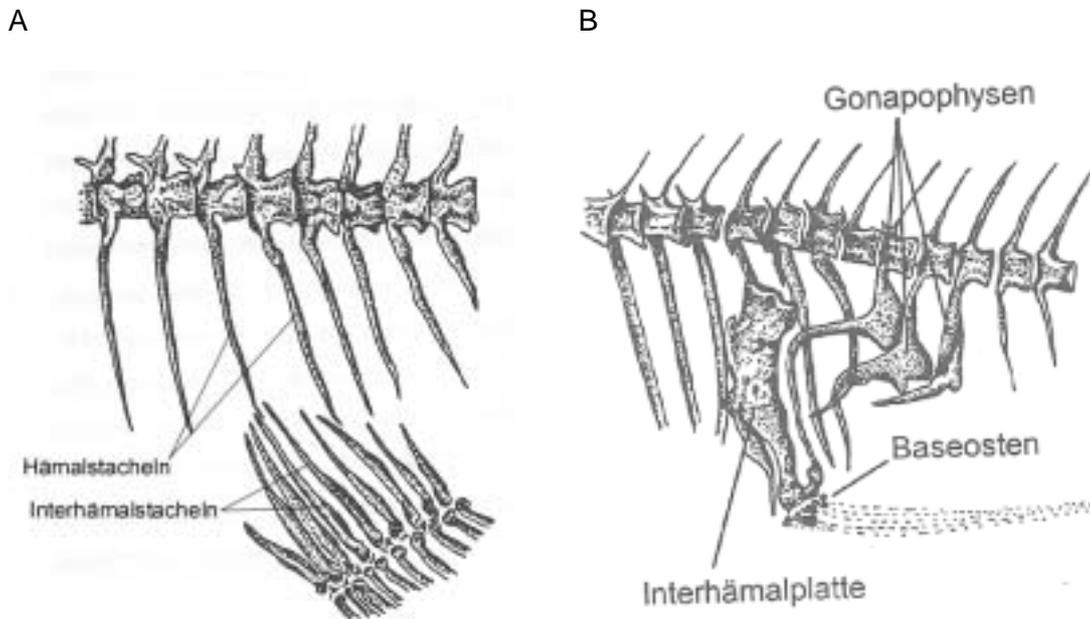


Abbildung 39: (A) Knöchernen Strukturen der Analflosse bei weiblichen Poeciliiden und (B) Umbildung zum Suspensorium bei männlichen Poeciliiden (nach Döbler, 1998).

Testes

Männliche Poeciliiden besitzen paarige Testes, die dorsal in der Leibeshöhle aufgehängt sind (Rosen & Bailey, 1963). Von dem großen zentralen Lumen gehen radial Samenkanäle ab, die über interstitielles Bindegewebe verbunden sind. In dem Bindegewebe liegen Leydig-Zwischenzellen, die die vorherrschenden männlichen Sexualhormone produzieren. Die Samenkanäle enden blind an der Wand der Testes (= Apex). Dort liegen isolierte Spermatogonien (Stadium 1) und Sertoli-Zellen, die sich zu Zysten vereinigen. Auf dem Weg zum zentralen Lumen durchlaufen die Zysten die verschiedenen Stadien der Spermatogenese (primäre und sekundäre Spermatozyten; Stadium 2), Spermatischen (Stadium 3) bis hin zu den Spermatozeugmata (nicht eingekapselte Spermienbündel), die reife Spermien (Stadium 4) enthalten. Die verschiedenen Stadien 1-4 können anhand des zunehmenden Kondensierungszustands des Chromatins identifiziert werden (DeFelice & Rasch, 1969; Billard, 1984).

Die Spermienbündel haben einen Durchmesser von 10-20 μm (Kuntz, 1913) und enthalten ca. 4000 – 5500 Spermien (Kallman, 1975), deren Köpfe in der Peripherie liegen. Die Spermenschwänze ragen ins Lumen der Spermatozeugmata (Rosen & Bailey, 1963). Die Spermienbündel gelangen über das zentrale Lumen zum Gonodukt des Männchens und werden bei der Kopulation mit Hilfe des Gonopodiums übertragen. Sekrete im Gonodukt des Weibchens setzen die Viskosität der die Spermatozeugmata umgebenden Hülle soweit herab (Chambers, 1987), daß diese innerhalb von 10-15 Minuten aufbrechen (Kadow, 1954) und die Spermien freisetzen.

Anhand von histologischen Analysen sollte überprüft werden, ob es sich bei den Gonaden der *P. formosa*-Männchen tatsächlich um Testisgewebe handelt und inwieweit die Spermatogenese abläuft.

Spermien

Die Spermien der Poeciliiden haben einen lanzenartigen Kopf, ein Mittelstück mit großem Glykogenspeicher (Billard, 1986) und einen langen begeißelten Schwanz (Kuntz, 1913). Im Vergleich zu Spermien anderer Fische ist deren Motilitätsdauer durch den hohen Glykogenspeicher deutlich verlängert. Monaco et al. (1981) fanden, daß das Verhältnis reifer Gameten zu den anderen Stadien unabhängig von der Standardlänge oder der Dominanz eines Männchens ist. Allerdings zeigen Männchen, die von Weibchen isoliert gehalten wurden, eine Anhäufung reifer Spermien. Die Isolation der Männchen über mehrere Tage sollte es daher ermöglichen, von einzelnen *P. formosa*-Männchen Spermien zu gewinnen und diese auf Morphologie, Motilität und DNA-Gehalt zu untersuchen.

5.1.2 Meiotische Chromosomen der männlichen Keimbahn

In der Meiose laufen spezielle Zellteilungen ab, die die Ausbildung reduzierter Gameten zum Ziel haben. Obwohl einige Arten spezifische Modifikationen aufweisen (siehe Kapitel 1), folgt die überwiegende Zahl dem gleichen Grundmuster: Replikation von DNA in der prämeiotischen S-Phase, Paarung von homologen Chromosomen (Synapsis) und Crossing-over in der Prophase der Meiose I, zufällige Verteilung von homologen Chromosomen in der Anaphase I,

sowie Segregation von Schwester-Chromatiden in der Anaphase II (Abbildung 40). Die meisten Vorgänge stehen unter genetischer Kontrolle (Baker et al., 1976).

Die Ausbildung von Bivalenten der homologen Chromosomen wird in der Prophase der ersten Reifeteilung durch den sog. „synaptonemalen Komplex“ (SC) vermittelt, der erstmals von Moses (1956) und Fawcett (1956) in den Spermatozyten von Arthropoden und Wirbeltieren beschrieben wurde. Diese Proteinstruktur besteht aus zwei Lateralelementen und einem dazwischen liegenden Zentralelement. Die lateralen Elemente werden im Leptotän, dem ersten Stadium der Prophase I, von den sich kondensierenden, homologen Chromosomen noch vor ihrer Paarung ausgebildet. Während des späten Zygotäns beginnt mit der Ausbildung des SC die Paarung der Homologen und ist zu Beginn des Pachytäns abgeschlossen. Das Pachytän ist ein besonders lang dauerndes Stadium der meiotischen Prophase I, währenddessen auch der Austausch chromosomaler Abschnitte der Homologen durch Crossing-over stattfindet. Während im Diplotän die Struktureinheit der SC aufgelöst wird und das Zentralelement nicht mehr erkennbar ist, bleiben die lateralen Elemente der Chromosomen noch einige Zeit erhalten. Die Paarungsverbindungen bleiben aufgrund der Chiasmata noch erhalten, und es findet eine starke Vermehrung des Zytoplasmas statt, ohne daß wie sonst eine Zellteilung ausgelöst würde. Diese Phase hoher physiologischer Aktivität entspricht dem Lampenbürstenstadium im Oozytenkern. Das Diplotän ist das längste Stadium der meiotischen Prophase I. In der Diakinese gelangen die Chiasmata nach distal, so daß die Chromosomen nur noch in der Telomerregion verbunden sind und als ringförmige Strukturen im Mikroskop erkannt werden können. Der Diakinese schließt sich unmittelbar die Metaphase I an. Die beschriebenen Vorgänge laufen in den primären Spermatozyten ab. *Per definitionem* werden die Zellen nach der Reduktionsteilung als sekundäre Spermatozyten bezeichnet.

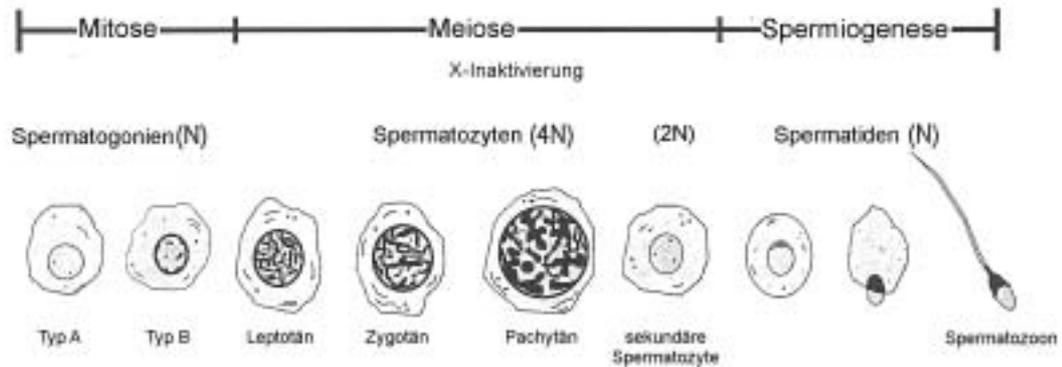


Abbildung 40: Darstellung der drei Abschnitte der Spermatozytogenese. Mitotische Vermehrung der Stammzellen, Meiose I mit Paarung der Chromosomen und Rekombination, Spermio-genese (nach Krawetz et al., 1999).

Da es sich bei *P. formosa* um einen unisexuellen Organismus mit asexueller Fortpflanzung handelt, der apomiktisch unreduzierte Eizellen herstellt, stellt sich die Frage, ob und inwieweit Meiose in den oben genannten phänotypischen Männchen stattfindet. Die Ergebnisse sollen anschließend mit den Ergebnissen bei Hybrid-Männchen und Männchen der Elternarten verglichen werden.

5.1.3 Sexualverhalten

Der Fortpflanzungserfolg eines Individuums ist nicht nur davon abhängig, ob es sexuelle Verhaltensweisen zeigt, sondern auch auf welchen Partner sich diese Verhaltensweisen richten (Adkins-Regan et al., 1997).

Durch ihr Wirken auf das neuronale System (Gerall & Givon, 1992) beeinflussen die Sexualhormone, die während der frühen Entwicklung eines Individuums vorhanden sind, stark das Kopulationsverhalten eines Individuums (=organisierende Funktion der Sexualhormone). Schlupp et al. (1992) konnten nachweisen, daß künstlich mit Testosteron vermännlichte *P. formosa*-Weibchen („Hormonmännchen“) die gleichen sexuellen Verhaltensweisen zeigten wie die Männchen der sexuellen Elternarten.

Neuere Studien an gynogenetischen Goldfischen (*Carassius auratus langsdorfii*, Kobayashi & Nakanishi, 1999) weisen darauf hin, daß im Gegensatz zu Säugern das Gehirn von Knochenfischen nicht organisierend auf ein Geschlecht geprägt wird („sexual bipotentiality of the brain“), sondern daß männliches Sexualverhalten auch im adulten Zustand durch Hormone hervorgerufen werden kann (=aktivierende Funktion der Sexualhormone).

Organisierende und aktivierende Effekte von Sexualhormonen verursachen also das unterschiedliche Wahl- und Paarungsverhalten von Männchen und Weibchen. Deshalb sollte untersucht werden, ob die *P. formosa*-Männchen in standardisierten Wahlversuchen die gleichen Bevorzungen gegenüber Weibchen und Männchen ihres Fortpflanzungskomplexes zeigen wie die Hybrid-Männchen. Neben Wahlversuchen, in denen die Männchen nur nach optischen Merkmalen wählen konnten, sollten die Männchen in sog. „Vollkontaktversuchen“ getestet werden, bei denen außer optischer auch chemische Information aufgenommen werden kann. Dies geschieht besonders beim „Nippen“ des Männchens an der Genitalpore des Weibchens (Parzefall, 1969).

5.1.4 Fertilität

Durch die Verpaarungen mit *P. formosa*-Weibchen und *P. mexicana*-Weibchen sollte die Fertilität der *P. formosa*-Männchen überprüft werden. Falls Jungtiere aus diesen Verpaarungen hervorgehen sollten, ließe sich aus deren Ploidiegrad sowie deren genetischem Hintergrund durch einen DNA-Fingerprint auf die Art der Fortpflanzung Rückschlüsse ziehen sowie evtl. paternale Introgression nachweisen.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Fische

Die *P. formosa*-Männchen entstanden alle in einem bestimmten Laborstamm diploider Tiere, deren Karyotyp mehrere (1-3) Mikrochromosomen aufweist (Schartl et al., 1995b; 1997; siehe auch Kapitel 3). Diese gefleckten Weibchen werden normalerweise mit einem Männchen angepaart, das die Wildtyp-Färbung aufweist z.B. *P. mexicana* oder Liberty Molly (Schröder, 1964), um eventuelle paternale Introgressionen phänotypisch detektieren zu können. Da das zweite und dritte Mikrochromosom nicht stabil vererbt wird, sind in jedem Wurf etwa 30% der Tiere ungefleckt. Diese werden nach ca. 6 Monaten aus dem Stamm aussortiert. Die *P. formosa*-Männchen sind demzufolge mit gefleckten und ungefleckten Schwestern aufgewachsen.

Zum Vergleich wurden Männchen gonochoristischer Arten (*P. mexicana*- und *P. latipinna*) herangezogen. Da es sich bei *P. formosa* ursprünglich um eine Hybridart handelt, dienten auch Hybrid-Männchen (*P. latipinna* F.O. 38 x *P. mexicana* F.O. 38) als Vergleichsgruppe (Abbildung 41). Alle entstandenen Hybride (Männchen und Weibchen, N = 30) wiesen die Wildtyp-Pigmentierung auf. Sie verpaarten sich innerhalb des Stammbeckens und produzierten Nachwuchs beiderlei Geschlechts, ohne daß die trächtigen Weibchen isoliert oder die Nachkommen einzeln registriert wurden.



Abbildung 41: Hybrid-Männchen

5.2.2 Fertilität

Die Männchen wurden mit gynogenetischen (*P. formosa* gefleckt und ungefleckt) und sexuellen Weibchen (*P. mexicana*) angepaart. Alle diese Weibchen waren jungfräulich, um SpermienSpeicherung auszuschließen. Trächtige Weibchen wurden bis zur Geburt isoliert, und jeder Wurf separat aufgezogen, so daß eine Zuordnung der Jungen zu Mutter und Vater gegeben war. Ging nach 12-17 Monaten aus einer Verpaarung kein Nachwuchs hervor, wurde der Versuch als nicht erfolgreich abgeschlossen. Diese Weibchen wurden dann mit Männchen einer gonochoristischen Art verpaart, um festzustellen, ob das Ausbleiben von Nachwuchs auf Sterilität der Weibchen zurückzuführen war. Dies konnte jedoch in allen Fällen ausgeschlossen werden.

5.2.3 Morphologie

Habitus

Der Habitus aller entstandenen *P. formosa* Männchen wurde fotografisch dokumentiert.

Gonopodium und Suspensorium

Die knöchernen Strukturen des Suspensoriums und Gonopodiums werden mit Hilfe der Dawson-Technik dargestellt. Diese Methode basiert auf der Mazeration des Gewebes mit KOH, Anfärben der Knochen mit Alizarinrot, sowie dem Ersetzen der Körperflüssigkeiten durch Glycerin (Aufklaren).

Das in 4% Formaldehyd/Fisch-PBS fixierte Gewebe wird zweimal 15 min gewässert und anschließend in 0.3 % Alizarinrot in 3 % KOH überführt. Darin wird das Gewebe so lange belassen, bis die Knochen eine intensiv rote Farbe angenommen haben und gut durch das Gewebe zu sehen sind. Ist das Alizarinrot vorzeitig aus der Lösung aufgebraucht, wird diese erneuert. Anschließend wird das Gewebe steigenden Konzentrationen von Glycerin ausgesetzt und zuletzt in reinem Glycerin aufbewahrt. Die Strukturen des komplexen Inseminationsapparates wurden unter einem Mikroskop (Stemi SV 11, Zeiss) fotografisch festgehalten und auf folgende Merkmale untersucht:

Gonopodium:

- Ausbildung eines Löffels
- Ausbildung einer Klaue am Ende des Analflossenstrahls 5p
- Anzahl der inneren Zähne des Analflossenstrahls 4p
- Ausrichtung des Endes des Analflossenstrahls 4p
- Ausbildung eines Hakens am Ende des Analflossenstrahls 3
- Ausbildung von ventralen Dornen und dorsalen Zähnen am Analflossenstrahl 3
- Länge des Analflossenstrahls 6

Suspensorium:

- Ausbildung von Gonapophysen
- Ausbildung der Interhämälplatte

5.2.4 Sexualverhalten

Optische Wahlversuche

Das Versuchsbecken aus Plexiglas ist bis auf die Frontwand mit schwarzer Folie beklebt und wurde mittels zweier durchsichtiger Plexiglasscheiben in drei Bereiche unterteilt: Die Länge des mittleren Beckens beträgt 41.5 cm, die der beiden Seitenbecken jeweils 14 cm. Das mittlere Becken ist für den Beobachter durch aufgezeichnete Linien nochmals in 3 annähernd gleich große Bereiche eingeteilt (Abbildung 42). Das Versuchsbecken ist 16 cm tief und 28 cm hoch und faßt ca. 18l. Der Versuchsaufbau wird von einer handelsüblichen Aquarienlampe beleuchtet, die direkt auf dem Becken liegt. Die Versuche sollten in einem abgedunkelten Beobachtungsraum durchgeführt werden, so daß der Beobachter für die Fische möglichst nicht wahrzunehmen ist. Die Versuchstiere werden min. 24 h vor Versuchsbeginn von den Weibchen isoliert. Dadurch erhöht sich die Motivation der Tiere, Sexualverhalten zu zeigen (Franck, 1975).

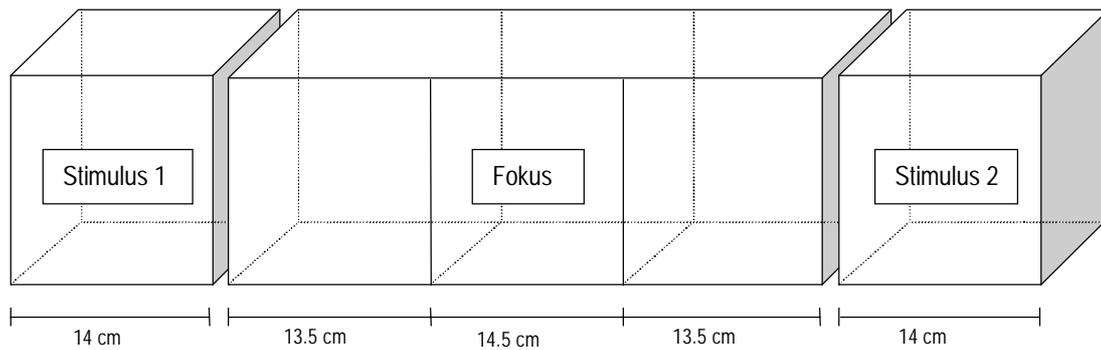


Abbildung 42: Versuchsaufbau des standardisierten optischen Wahlversuchs

Für die optischen Wahlversuche wurden zwei Stimulustiere gleicher Größe ($\pm 2\text{mm}$) jeweils in zufälliger Anordnung in die äußeren Abteile gesetzt. Dann wird das zu testende Männchen in einen Plexiglaszylinder gesetzt, der sich zentral stehend in dem mittleren Becken befindet. Nach 5 minütiger Eingewöhnungszeit wird der Zylinder herausgezogen, so daß sich das Männchen frei im mittleren Becken bewegen kann. In der darauffolgenden 5 minütigen Beobachtungsphase wird die Zeit registriert, die sich das Männchen in dem linken bzw. rechten Bereich des mittleren Beckens aufhält. Die Zeit, die sich das Männchen links verbrachte, wird hierbei als Wahl für das Stimulustier im linken Abteil angesehen, die Zeit, die es im rechten Bereich verbringt, als Wahlzeit für das rechte Stimulustier (Kondric-Brown 1989; Döbler et al., 1997; Schlupp et al., 1991). Die beiden äußeren Bereiche des mittleren Beckens werden daher als Wahlzonen, der mittlere Bereich als neutrale Zone bezeichnet. Jeder Versuch wird mit vertauschten Stimulustieren wiederholt, um Seitenpräferenzen einzelner Tiere auszuschließen. Für beide Stimulustiere werden dann jeweils die Zeiten addiert, die das Männchen während der beiden Versuchsteile in ihrer Nähe verbrachte. Für jeden Versuch müssen andere Stimuluspaare gewählt werden, so daß eine individuelle Bevorzugung eines bestimmten Stimulustieres ausgeschlossen werden kann.

Wenn sich ein Männchen $\geq 80\%$ des Beobachtungszeitraumes (in beiden aufeinanderfolgenden Versuchsteilen mit ausgetauschten Stimulustieren) in einer der beiden Wahlzonen aufhält, wird davon ausgegangen, daß es eine Seitenpräferenz besitzt. Dieser Versuch wird von der Wertung ausgeschlossen. Ebenfalls ausgeschlossen werden Versuche, in denen das Männchen weniger als 66 % der Beobachtungszeit in den Wahlzonen verbringt, da es sich – statistisch gesehen – bereits bei gleichmäßigem Umherschwimmen je 33 % der Zeit in jeder der beiden Wahlzonen aufhalten müßte. Tut es dies nicht, so muß davon

ausgegangen werden, daß das Testtier nicht motiviert ist, zwischen den beiden Stimulustieren zu wählen. Aufgrund der geringen Anzahl an *P. formosa*-Männchen wurden die ungültigen Versuche am nächsten Tag mit neuen Stimulustieren wiederholt.

In den optischen Wahlversuchen konnten die *P. formosa*-Männchen zwischen folgenden Kombinationen wählen, wobei die Reihenfolge aller Versuche nach dem Zufallsprinzip bestimmt wurde:

<i>P. formosa</i> -Weibchen	–	<i>P. mexicana</i> -Weibchen
<i>P. formosa</i> -Weibchen	–	<i>P. latipinna</i> -Weibchen
<i>P. mexicana</i> - Weibchen	–	<i>P. latipinna</i> -Weibchen
<i>P. mexicana</i> -Weibchen	–	<i>P. mexicana</i> -Männchen
<i>P. formosa</i> -Weibchen gefleckt	–	<i>P. formosa</i> -Weibchen ungefleckt

Die Hybrid-Männchen hatten zusätzlich zu diesen Kombinationen noch die Wahl zwischen:

<i>P. latipinna</i> -Weibchen	–	<i>P. latipinna</i> -Männchen
<i>P. formosa</i> -Weibchen	–	Hybrid-Weibchen
<i>P. mexicana</i> -Weibchen	–	Hybrid-Weibchen
<i>P. latipinna</i> -Weibchen	–	Hybrid-Weibchen

Wahlversuche im Vollkontakt

Zusätzlich zu den standardisierten optischen Wahlversuchen wurden die zuvor isolierten *P. formosa*-Männchen jeweils mit zwei nicht-rezeptiven Weibchen in einem 18 l Becken (41,5 x 28 x 16 cm) getestet. Dazu werden die beiden Stimulusweibchen gleicher Größe (± 2 mm) in das Becken gesetzt, das Männchen wird in einem durchsichtigen „Ablaich-Kästchen“ aus Plexiglas für eine Eingewöhnungszeit von 10 min dazugesetzt. Anschließend wird das Männchen vorsichtig aus dem Ablaich-Kästchen befreit und seine Interaktionen mit den beiden Stimulusweibchen nach der Fokustier-Methode (Altmann, 1974) für 10 min protokolliert. Dabei wurden die Verhaltensweisen „Folgen“, „Nippen“, „Balz“ und „Kopulation“ bzw. „Kopulationsversuch“ (Parzefall, 1969) festgehalten. Da *P.*

latipinna-Männchen ein ausgeprägtes Balzverhalten zeigen, *P. mexicana*-Männchen jedoch nicht (Parzefall, 1969), wurde registriert ob und in wie weit Balzverhalten bei den *P. formosa*- bzw. den Hybrid-Männchen auftrat.

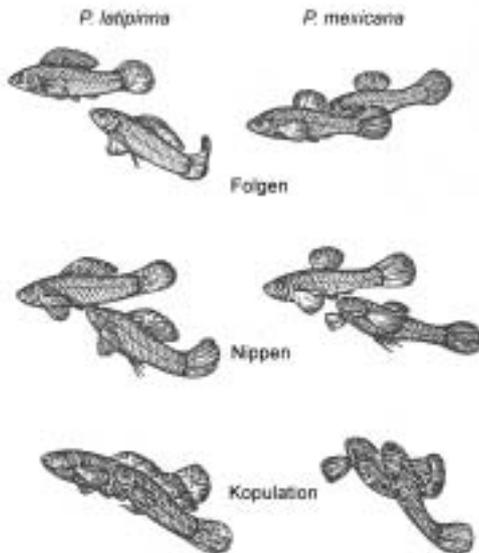


Abbildung 43: Graphische Darstellung der festgehaltenen Verhaltensweisen „Folgen“, „Nippen“ und „Kopulieren“ bzw. „Kopulationsversuch“. Verändert nach Schlupp et al. (1991).

Im Vollkontakt konnten die *P. formosa*-Männchen zwischen folgenden Stimuli wählen:

- | | | |
|--------------------------------------|---|--|
| <i>P. formosa</i> -Weibchen | – | <i>P. mexicana</i> -Weibchen |
| <i>P. formosa</i> -Weibchen | – | <i>P. latipinna</i> -Weibchen |
| <i>P. mexicana</i> -Weibchen | – | <i>P. latipinna</i> -Weibchen |
| <i>P. formosa</i> -Weibchen gefleckt | – | <i>P. formosa</i> -Weibchen ungefleckt |

Die Hybrid-Männchen sollten zusätzlich noch zwischen den folgenden Stimuluspaaren wählen:

- | | | |
|-------------------------------|---|-----------------|
| <i>P. mexicana</i> -Weibchen | – | Hybrid-Weibchen |
| <i>P. latipinna</i> -Weibchen | – | Hybrid-Weibchen |

Das Stimuluspaar *P. formosa* – Hybrid-Weibchen konnte im Vollkontakt nicht getestet werden, da die Hybrid-Weibchen für den Experimentator optisch nicht von den *P. formosa*-Weibchen zu unterscheiden waren. Die einzelnen

Versuche wurden mit einem Wilcoxon-Test für gepaarte Daten ausgewertet. Alle p-Werte sind zweiseitig. Um die Verhaltensweisen von *P. formosa*-Männchen und Hybrid-Männchen vergleichen zu können, wurden die einzelnen Aufenthaltszeiten (t) bzw. die Häufigkeiten einer Verhaltensweise (Folgen, Nippen, Kopulation) durch Subtraktion zueinander in Verhältnis gesetzt:

$(t_1 - t_2) P.f. \Gamma_x$	$(t_A - t_B) Hyb \Gamma_x$
-----------------------------	----------------------------

wobei t_1 die Aufenthaltszeit des *P. formosa*-Männchens X bzw. des Hybrid-Männchens X vor Stimulus 1 ist und t_2 die Aufenthaltszeit vor Stimulus 2. Dadurch konnten die beiden Gruppen anschließend mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Daten verglichen werden.

5.2.5 Bestimmung des DNA-Gehalts mittels Durchflußzytometrie

Der DNA-Gehalt der somatischen Zellen wurde bestimmt wie unter 4.2.3 beschrieben.

5.2.6 Präparation von Mitose-Chromosomen aus Fischorganen

Die Präparation von Mitose-Chromosomen erfolgte wie unter 4.2.4 beschrieben.

5.2.7 Isolierung hochmolekularer DNA

Die DNA-Extraktion aus gefrorenem Gewebe und deren Konzentrationsbestimmung wurde wie unter 4.2.5 beschrieben durchgeführt.

5.2.8 Präparation des synaptonemalen Komplexes

Dem auf Eis betäubten und anschließend dekapitierten Fisch wird vorsichtig ventral der Bauchraum geöffnet, die Gonaden entnommen und in 1 x Fisch-PBS (Phosphate-buffered saline) auf Eis gelegt. Handelte es sich um Testisgewebes, so wurde ein Teil davon in frische eiskalte 1 x Fisch-PBS übertragen und mit der Schere zerkleinert. Nachdem sich die groben Gewebeteile abgesetzt haben, wird

der Überstand 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Bei der geringen Geschwindigkeit sedimentieren hauptsächlich die diploiden Geschlechtszellen (primäre Spermatozyten), haploide Zellen (sekundäre Spermatozyten) und reife Spermien verbleiben im Überstand. Das Pellet wird anschließend in einer kleinen Menge eiskalter 1 x Fisch-PBS resuspendiert, so daß eine milchige Zellsuspension entsteht.

1 x Fisch-PBS: 100 mM NaCl
 2 mM KCl
 6 mM Na₂HPO₄
 1 mM KH₂PO₄
 pH 7.4

Für die lichtmikroskopische Analyse wird mit einer Pasteurpipette 1 Tropfen 0.15 M Saccharose (pH 8.4) auf einen sauberen Objektträger gegeben, auf den vorsichtig ein Tropfen der Zellsuspension aufgebracht wird. Nach 10 minütiger Inkubationszeit in einer Feuchtekammer wird das Material mit 5-8 Tropfen Fixativ (pH 8.2) überschichtet und 45-60 min in der feuchten Kammer fixiert. Anschließend werden die Objektträger 1 min in Fotoflo (pH 8.2, Kodak) gespült und luftgetrocknet. Die Präparate können im Phasenkontrast kontrolliert werden. Bei der Präparation erhält man hauptsächlich Zellen im Pachytän, da es sich dabei um ein besonders lang dauerndes Stadium der Prophase I handelt.

Fixativ: 0.1 M Saccharose
 4% Para-Formaldehyd
 in H₂O auf 60-70°C erhitzen
 Zugabe von 1 N NaOH, bis Lösung sich klärt
 Abkühlen auf RT
 0.1g Triton-Xiphophorus
 pH 8.2 mit 0.01 M Borat-Puffer (Merck, pH 9.22)
 (bis zu 12 Wochen verwendbar)

Saccharose:	0.15 M Saccharose pH 8.4 mit Borsäure (200 mM) (4-6 Wo verwendbar)	Fotoflo:	0.5% Fotoflo pH 8.2 mit Borat- Puffer (0.01 M) (Merck, pH 9.22) (immer frisch ansetzen)
-------------	---	----------	--

Zur Auswertung im Transmissions-Elektronenmikroskop wurden die Objektträger mit 1% Optilux / Chloroform (w/v) beschichtet und die Beschichtung mit Nagellack fixiert, bevor die Zellen wie oben beschrieben präpariert werden konnten.

Optilux: 1 g zerkleinerte Zellkulturschale
in 100 ml Chloroform lösen
filtrieren

Die Färbung des Proteinkomplexes erfolgt auf einer Heizplatte bei 50°C. Auf den angewärmten Objektträger werden mittig 6 Tropfen 2 %ige Gelatine als Entwickler und 3 Tropfen 50%iges Silbernitrat aufgetropft. Das Deckglas soll möglichst luftblasenfrei aufgebracht werden. Bei leichtem Schwenken soll das Präparat färben bis es dunkelbraun ist und sich kleine Bläschen bilden. Daraufhin wird das Deckglas abgestreift, das Präparat gründlich in warmen Aqua dest. gespült und luftgetrocknet.

Gelatine:	2% Gelatine 1% Ameisensäure bei ca. 80°C lösen	Silbernitrat:	50% AgNO ₃
-----------	--	---------------	-----------------------

Nach erfolgter Färbung können die Strukturen des synaptonemalen Komplexes sofort im Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 1000x analysiert werden. Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie muß die Optilux-Beschichtung mit den darauf präparierten synaptonemalen Komplexen abgelöst werden. Dazu wird die Folie mit einer Rasierklinge entlang des Nagellacks geschnitten und der Objektträger in Aqua dest. getaucht. Infolge der Oberflächenspannung schwimmt die Beschichtung auf. Dort wird sie möglichst flächendeckend mit EM-Netzchen

belegt, mit Hilfe von Parafilm aus dem Wasser geholt und getrocknet. Auf den EM-Netzchen werden die Präparate ins Elektronen-Mikroskop eingeschleust und bei Vergrößerungen von 1250x (Übersicht) – 6300x (Detail) bei 60 – 80 kV fotografiert.

5.2.9 Präparation von Meiose-Chromosomen aus Testisgewebe

Die Präparation der meiotischen Chromosomen erfolgte im Wesentlichen nach der Methode von Evans et al. (1964), allerdings mit einigen Abwandlungen. Ein Teil der Testes bzw. die groben Gewebeteile, die bei der Präparation des synaptonemalen Komplexes nicht benötigt werden, werden für 45 min einer hypotonen Behandlung (46 mM KCl) unterzogen und anschließend in frischem eiskalten Carnoy's Fixativ über Nacht bei 4°C fixiert.

Die Gewebestücke werden auf einer Heizplatte bei 42°C in 50% Essigsäure mit einem Skalpell zerkleinert und so lange mit einer silikonisierten Pipette auf- und abpipettiert, bis eine milchige Suspension entsteht. Diese wird mit Hilfe der Pipette auf dem Objektträger verteilt. Dabei werden überwiegend Chromosomen im Diplotän und in der Diakinese erhalten. Nach dem Trocknen der Präparate wurden die Meiose-Chromosomen einer herkömmlichen Giemsa-Färbung unterzogen und anschließend im Lichtmikroskop analysiert.

5.2.10 Gewinnen von Spermien

Nach 48-stündiger Isolation wurde das Männchen anästhesiert und in einem feuchten Tuch unter einem Stereo-Mikroskop (Stemi SV 11, Zeiss) plaziert. Zur Gewinnung von Spermien muß das Gonopodium ein- bis zweimal komplett nach cranial umgeklappt werden. Erst dann wird der Fisch vorsichtig mit zwei stumpfen, abgerundeten Glasstäben beidseitig vom Vorderbauch in Richtung Gonopore ausgestrichen. Die austretenden Spermienbündel (Spermatozeugmata) werden dann mit einer feinen Glaspipette aufgenommen und fixiert – entweder zur durchflußzytometrischen Messung in 70% Ethanol oder für zytogenetische Analysen in Fixativ (Methanol : Essigsäure, 3 : 1, v : v).

5.2.11 Multilocus DNA-Fingerprints

DNA-Fingerprints wurden angefertigt wie unter 4.2.6 beschrieben.

5.2.12 Histologie der Gonaden

Fixierung des Gewebes

Das freipräparierte Testisgewebe wurde in 4% Formaldehyd-Lösung in Fisch-PBS bei RT ca. 2 Tage fixiert, bevor es zur Herstellung von Paraffinschnitten benutzt werden konnte. Die Gewebsschnitte und HE-Färbung der Präparate wurde von R. Wacker am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I der Universität Würzburg durchgeführt.

Herstellung von Paraffinschnitten

Zunächst wird das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100%) dehydriert und nach einigen Stunden in absolutem Alkohol in Chloroform äquilibriert. Anschließend wird das Gewebe bei 60°C in Paraffin eingelegt und nach mehrmaligem Tauschen des Paraffins schließlich in einen Paraffinblock eingebettet.

Der bei RT ausgehärtete Paraffinblock wird nun in ein Mikrotom eingespannt und Schnitte einer Dicke von ca. 2-3 µm hergestellt. Die Schnitte werden mit einem Pinsel abgenommen und auf 45°C warmem Wasser schwimmend gestreckt, bevor sie auf einen Objektträger aufgebracht werden. Das Trocknen erfolgt im Wärmeofen bei 45-50°C für min. 30 Minuten.

Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung

Zur Färbung werden die Gewebsschnitte entparaffiniert, indem sie einmal 3 – 4 min in angewärmtem Xylol und zweimal mit Xylol bei RT behandelt und anschließend über eine absteigende Alkoholreihe in Wasser überführt werden. Nach 5 minütigem Färben in Cole´s Hämatoxilin-Lösung werden die Objektträger kurz in Aqua dest. getaucht und anschließend 10 – 15 min in warmen Leitungswasser (leicht alkalisch) gebläut. Für die Gegenfärbung werden die Schnitte 3 min in 0.1 % wässriger Eosin Y-Lösung (Sigma) gefärbt. Hämatoxilin führt zu einer dunkelvioletten Kernfärbung, während Eosin das Zytoplasma rotviolett erscheinen lässt. Nach ausgiebigem Spülen in Leitungswasser werden die gefärbten Gewebsschnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol überführt. Nach mehrmaligem Tauschen des Xylols können die Präparate dauerhaft in Rotihistokitt (Roth) eingedeckt werden.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Habitus

Die entstandenen *P. formosa*-Männchen wiesen – bis auf Männchen 4 (Abbildung 44b) - alle ein Fleckenmuster auf (Abbildung 44a, c-f), allerdings in unterschiedlicher Ausprägung und deutlich geringer als die übrigen Individuen der Population (Abbildung 44h). Die typischen männlichen Körperproportionen waren bei allen *P. formosa*-Männchen ausgeprägt, während die gelbe Flossenfärbung (Parzefall, 1969) nur bei Männchen 4 und 7 (Abbildung 44b und e) stark ausgeprägt war. In 5 von 6 Fällen stammte das dritte Genom von einem Liberty Molly-Männchen (Abbildung 44g).

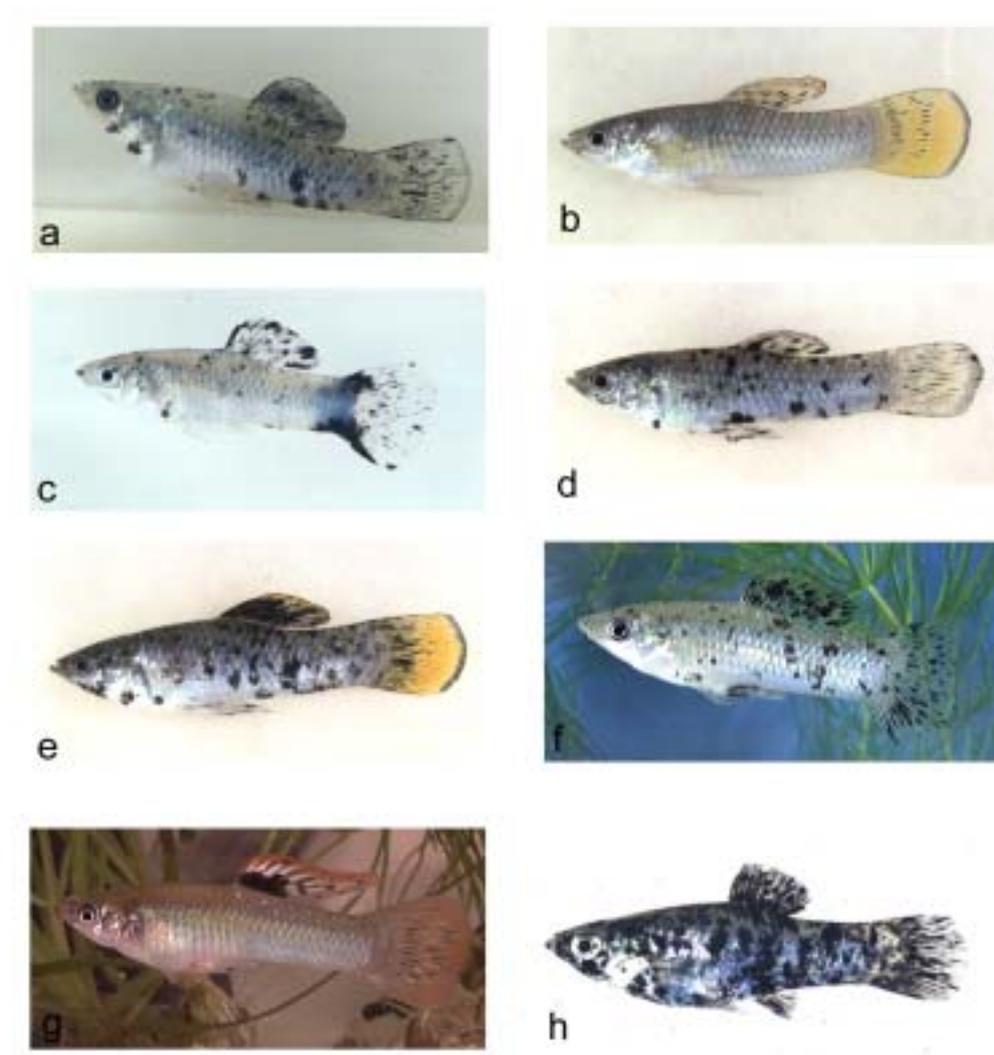


Abbildung 44: Habitus der *P. formosa*-Männchen 3-8 (a-f) im Vergleich zu einem typischen gefleckten Weibchen der selben Population (h). Liberty Molly-Männchen (g).

5.3.2 DNA-Gehalt

Anhand von durchflußzytometrischen Messungen an Rückenflossenmaterial wurde festgestellt, daß alle *P. formosa*, die sich zu Männchen entwickelt hatten, triploid waren (Abbildung 45, Tabelle 5). Der durchschnittliche DNA-Gehalt der 6 analysierten *P. formosa*-Männchen betrug 2.95 ± 0.09 pg/Nukleus bei Streuung um den Mittelwert (CV) von 1.71 – 3.92 % (Tabelle 5).

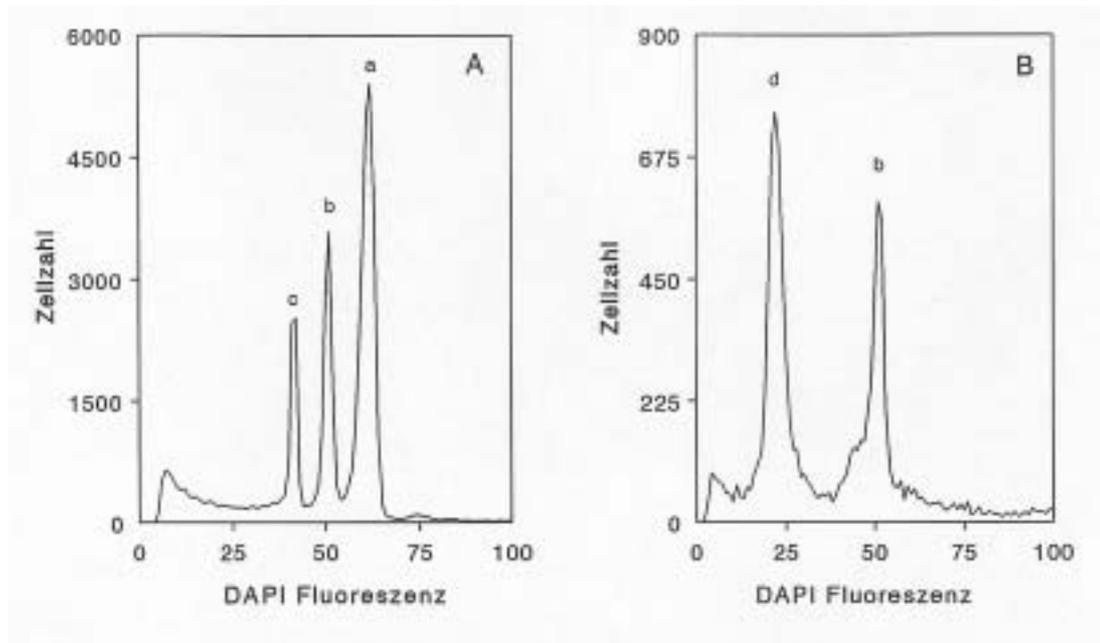


Abbildung 45: Durchflußzytometrische Messung von (A) Rückenflossenmaterial und (B) Spermien eines *P. formosa*-Männchens. Der DNA-Gehalt ist direkt proportional zu der Intensität des Fluoreszenz-Signals, die bestimmten Kanälen zugeordnet wird. Aus der Lage des Peaks läßt sich der triploide somatische Status der *P. formosa*-Männchen ableiten. a = somatische Zellen der Rückenflosse, b = Hühner-Erythrozyten, c = kultivierte Zellen einer diploiden Zelllinie, d = Spermien.

Spermien konnten von den *P. formosa*-Männchen 3, 4, 5 und 7 gewonnen werden. Die Spermien zeigten normale Morphologie (Abbildung 46) und Motilität im Vergleich zu jenen von *P. mexicana*-Männchen. Die durchflußzytometrischen Messungen des nukleären DNA-Gehalts von Spermien ergaben bei *P. formosa*-Männchen (N = 4) sehr breite Peaks (CV% 9.09-24.32), die einem DNA-Gehalt von 1.05-1.25 pg/Nukleus ($\bar{\varnothing}$ 1.18 ± 0.08 pg/Nukleus) entsprechen (Abbildung 47 und Tabelle 5).

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der durchflußzytometrischen Messungen des DNA-Gehaltes somatischer Zellen und Spermien der *P. formosa*-Männchen 3 bis 8. „Ratio“ gibt das Verhältnis zwischen dem Meßpeak von *P. formosa* zum Standardpeak von *Gallus gallus* an. Multipliziert man diesen Wert mit dem bekannten Wert des DNA-Gehalts vom Huhn (2.5 pg/Nukleus) so erhält man den DNA-Gehalt der Probe. CV% gibt die Standardabweichung vom Mittel (coefficient of variation) in Prozent an.

<i>P. formosa</i> ♂	Somazellen			F ₁	Spermien		
	Ratio	DNA-Gehalt [pg]	CV%		Ratio	DNA-Gehalt [pg]	CV%
3	1.22	3.05	2.54	✓ (4)	0.47	1.18	24.32
4	1.12	2.80	1.82	-	0.50	1.25	19.23
5	1.22	3.05	3.33	✓ (56)	0.49	1.23	23.21
6	1.14	2.85	2.63	-	-	-	-
7	1.19	2.98	3.92	✓ (33)	0.42	1.05	9.09
8	1.18	2.95	1.71	-	-	-	-
∅	1.18	2.95	2.66	4.43	0.47	1.18	18.96
	± 0.04	± 0.09	± 0.78	± 2.36	± 0.03	± 0.08	± 6.00

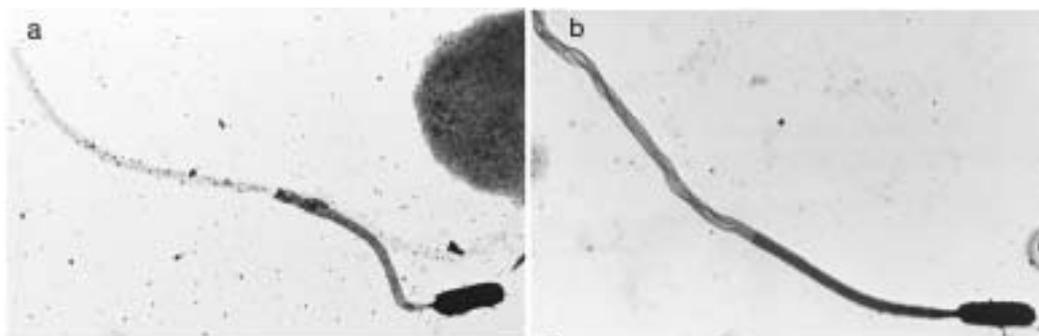


Abbildung 46: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer reifen Spermienzelle von (a) *P. formosa*-Männchen 5 und (b) einem *P. mexicana*-Männchen (3150 x, 80 kV).

Im Vergleich dazu zeigten die 6 Hybrid-Männchen einen diploiden nukleären DNA-Gehalt von durchschnittlich 2.09 ± 0.02 pg (Abbildung 47 und Tabelle 6). Die durchflußzytometrische Messung der Spermien ergab sehr schmale Peaks mit einem CV% von 2.94-4.84. Der DNA-Gehalt lag bei 0.82 ± 0.04 pg/Nukleus.

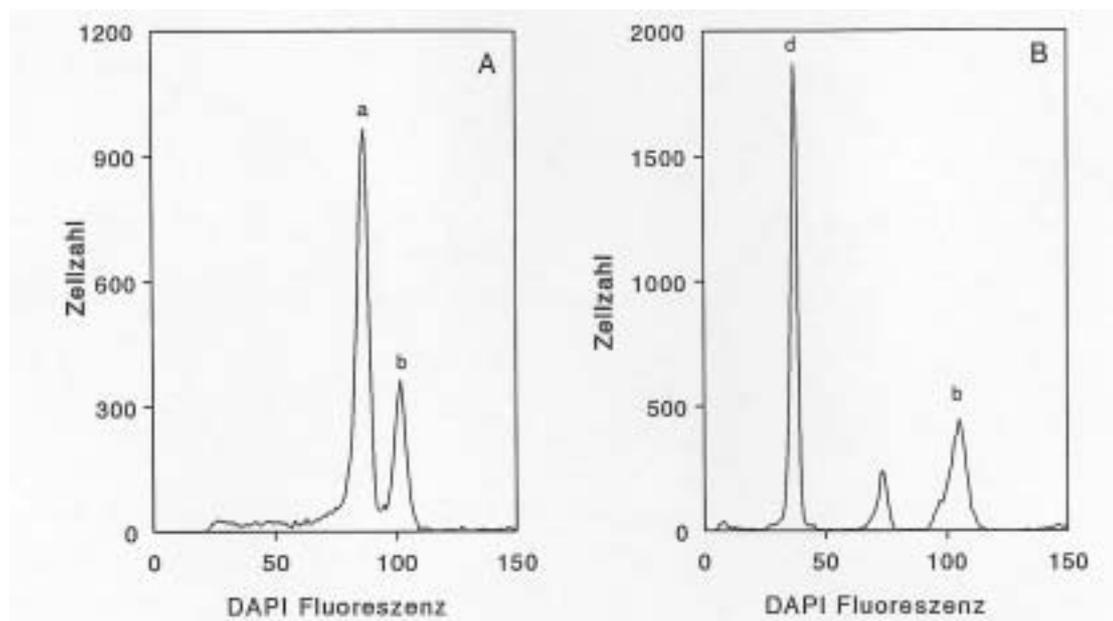


Abbildung 47: Durchflußzytometrische Messung an (A) Rückenflossenmaterial und (B) Spermien eines Hybrid-Männchens. a = somatische Zellen der Rückenflosse, b = Hühner-Erythrozyten, d = Spermien

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der durchflußzytometrischen Messungen des DNA-Gehaltes somatischer Zellen und Spermien von Hybrid-Männchen 1 bis 6.

Hybrid-♂	Somazellen			F ₁	Spermien		
	Ratio	DNA-Gehalt [pg]	CV%		Ratio	DNA-Gehalt [pg]	CV%
1	0.84	2.10	4.02	✓	0.35	0.88	4.17
2	0.83	2.08	2.47	✓	0.34	0.85	4.17
3	0.84	2.10	2.44	✓	0.32	0.80	4.69
4	0.84	2.10	3.01	✓	0.31	0.78	4.84
5	0.82	2.05	3.66	✓	0.33	0.83	2.94
6	0.85	2.13	2.41	✓	0.30	0.75	6.90
∅	0.84	2.09	3.00		0.33	0.82	4.62
	± 0.02	± 0.02	± 0.64		± 0.02	± 0.04	± 1.19

Dies entspricht etwa 80 % des erwarteten haploiden Wertes von 1.05 pg/Nukleus. Man kann dies wahrscheinlich darauf zurückführen, daß die DNA in den Spermien-Kernen sehr kompakt ist und sich deshalb schlechter anfärben läßt. Die Spermien der *P. formosa*-Männchen hingegen zeigen Werte, die im Mittel bei 1.18 pg/Nukleus liegen. Geht man davon aus, daß dieser Wert auch nur ca. 80 % des tatsächlichen DNA-Gehaltes darstellt, erhielte man ca. 1.48 pg/Nukleus, was etwa der Hälfte des somatischen DNA-Gehaltes entspricht.

5.3.3 Analyse mitotischer Chromosomen

Zusätzlich zu den Ploidiegrad-Bestimmungen wurden bei 5 der 8 *P. formosa*-Männchen mitotische Metaphase-Chromosomen präpariert. Die Zahl von $3n = 69$ akrozentrischen Chromosomen bestätigte die durchflußzytometrischen Ergebnisse.

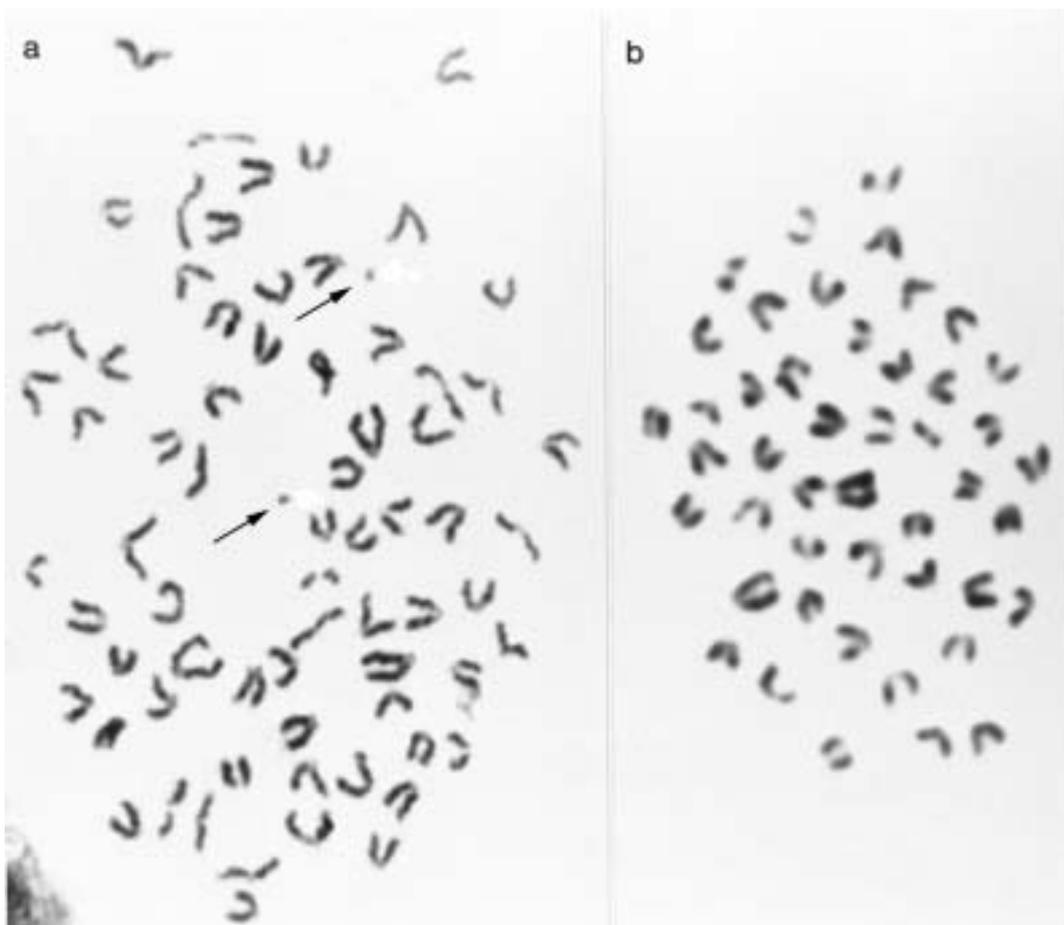


Abbildung 48: Darstellung der Mitose-Chromosomen im Metaphase-Arrest nach Colchizin-Behandlung der Fische. (a) Triploides *P. formosa*-Männchen mit $3n = 69$ akrozentrischen Chromosomen sowie 2 Mikrochromosomen (Pfeile); (b) diploides Hybrid-Männchen mit $2n = 46$ akrozentrischen Chromosomen.

Wie die gefleckten, diploiden Geschwister wiesen auch die gefleckten *P. formosa*-Männchen in den Chromosomen-Präparationen 2 bis 3 Mikrochromosomen auf (Abbildung 48a). Im Vergleich dazu zeigten die Hybrid-Männchen, wie die meisten bereits untersuchten Arten der Gattung *Poecilia*, $2n = 46$ akrozentrische Chromosomen (Abbildung 48b), ohne die Anwesenheit überzähliger Chromosomen bzw. Mikrochromosomen.

5.3.4 Männchen im optischen Wahlversuch

P. formosa-Männchen

Die Verhaltensanalysen der *P. formosa*-Männchen in optischen Wahlversuchen zeigten, daß diese keine Art (*P. formosa*, *P. mexicana*, *P. latipinna*) einer anderen vorziehen (Tabelle 7). Allerdings bevorzugten die *P. formosa*-Männchen signifikant das Männchen bei dem Stimuluspaar *P. mexicana*-Männchen – *P. mexicana*-Weibchen ($p = 0.016$, $N = 7$). Sollten die *P. formosa*-Männchen zwischen gefleckten und ungeflechten *P. formosa*-Weibchen wählen, so trafen sie keine eindeutige Wahl.

Tabelle 7: Darstellung des Wahlverhaltens der triploiden *P. formosa*-Männchen im optischen Wahlversuch. Die Primärdaten wurden mit dem Wilcoxon-Test ausgewertet. Der Stimulus, der signifikant bevorzugt wurde, ist grau hinterlegt. Falls nicht anders erwähnt, handelt es sich um Weibchen.

STIMULUS 1	STIMULUS 2	Stichprobe	Signifikanz
<i>P. formosa</i>	<i>P. mexicana</i>	N = 7	n.s. (1.000)
<i>P. formosa</i>	<i>P. latipinna</i>	N = 6	n.s. (0.438)
<i>P. mexicana</i>	<i>P. latipinna</i>	N = 7	n.s. (0.931)
<i>P. mexicana</i> ♂	<i>P. mexicana</i>	N = 7	** (0.016)
<i>P. formosa</i> gefleckt	<i>P. formosa</i> ungefleckt	N = 6	n.s. (0.688)

Hybrid-Männchen

Die Verhaltensanalysen der Hybrid-Männchen in optischen Wahlversuchen (Tabelle 8) zeigten, daß auch diese keine Individuen einer bestimmten Art bevorzugten. Konnten sie jedoch zwischen einem *P. latipinna*-Männchen und einem *P. latipinna*-

Weibchen wählen, entschieden sie sich signifikant häufiger für das Männchen ($p = 0.016$, $N = 7$). Sollten die Hybrid-Männchen zwischen einem *P. mexicana*-Männchen und einem *P. mexicana*-Weibchen wählen, so entschieden sie sich tendenziell häufiger für das Männchen. Dieses nicht-signifikante Ergebnis beruht auf einem Ausreißer, der bei einer Stichprobe von $N = 7$ sehr stark ins Gewicht fällt. Würde dieser Wert bei der Analyse nicht berücksichtigt, so erhielte man eine signifikante Bevorzugung der Hybrid-Männchen für die *P. mexicana*-Männchen ($p = 0.031$, $N = 6$). Bei der Wahl zwischen gefleckten und ungefleckten *P. formosa*-Weibchen hielten sich die Hybrid-Männchen jedoch signifikant länger vor dem ungefleckten *P. formosa*-Weibchen auf ($p = 0.016$, $N = 7$). Hatten die Hybrid-Männchen die Wahl zwischen den "arteigenen" Hybrid-Weibchen und den Weibchen der anderen „Arten“ (*P. latipinna*, *P. mexicana*, *P. formosa*) , so ergab sich ebenfalls kein signifikantes Ergebnis.

Tabelle 8: Darstellung des Wahlverhaltens der Hybrid-Männchen im optischen Wahlversuch. Die Rohdaten wurden mit dem Wilcoxon-Test ausgewertet. Dunkelgrau hinterlegte Felder zeigen signifikante Ergebnisse an, hellgraue Felder sind bei Streichen eines Extremwertes signifikant. Falls nicht anders erwähnt handelt es sich um Weibchen.

STIMULUS 1	STIMULUS 2	Stichprobe	Signifikanz
<i>P. formosa</i>	<i>P. mexicana</i>	$N = 7$	n.s. (0.938)
<i>P. formosa</i>	<i>P. latipinna</i>	$N = 7$	n.s. (0.078)
<i>P. mexicana</i>	<i>P. latipinna</i>	$N = 7$	n.s. (0.297)
<i>P. mexicana</i> ♂	<i>P. mexicana</i>	$N = 7$	n.s. (0.156)
<i>P. latipinna</i> ♂	<i>P. latipinna</i>	$N = 7$	** (0.016)
<i>P. formosa</i> gefleckt	<i>P. formosa</i> ungefleckt	$N = 7$	** (0.016)
<i>P. formosa</i>	Hybrid	$N = 7$	n.s. (0.469)
<i>P. mexicana</i>	Hybrid	$N = 7$	n.s. (0.375)
<i>P. latipinna</i>	Hybrid	$N = 7$	n.s. (0.688)

Vergleich der beiden Männchen-Typen

Der Vergleich der Verhaltensweisen der beiden Männchen-Typen in optischen Wahlversuchen konnte nur einen Unterschied aufzeigen (Tabelle 9): Während die Hybrid-Männchen die ungefleckten Weibchen signifikant bevorzugten, trafen die *P. formosa*-Männchen keine eindeutige Wahl, verbrachten jedoch tendentiell etwas mehr Zeit vor den gefleckten Weibchen. Der Vergleich lieferte ein signifikantes Ergebnis ($p = 0.005$).

Tabelle 9: Vergleich des Wahlverhaltens von Hybrid-Männchen und *P. formosa*-Männchen im optischen Wahlversuch. Die Vergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-U Test ausgewertet. Da die Werte zum zweiten Mal zu einer Analyse herangezogen wurden, gilt nach der Bonferroni-Korrektur eine Signifikanzschranke von $p = 0.05/2=0.025$. Grau hinterlegte Felder markieren das Stimuluspaar, bei dem sich signifikante Unterschiede ergeben haben.

STIMULUS 1	STIMULUS 2	Signifikanz	
<i>P. formosa</i>	<i>P. mexicana</i>	n.s.	(1.000)
<i>P. formosa</i>	<i>P. latipinna</i>	n.s.	(0.731)
<i>P. mexicana</i>	<i>P. latipinna</i>	n.s.	(0.620)
<i>P. mexicana</i> ♂	<i>P. mexicana</i>	n.s.	(0.456)
<i>P. formosa</i> gefleckt	<i>P. formosa</i> ungefleckt	***	(0.005)

5.3.5 Männchen in Vollkontaktversuchen*P. formosa*-Männchen

Im Vollkontakt erhält man ähnliche Ergebnisse für die *P. formosa*-Männchen wie im optischen Wahlversuch. Sie zeigten keine Präferenz für *P. formosa*, *P. mexicana* oder *P. latipinna*. Ebenso trafen sie keine eindeutige Wahl zwischen gefleckten oder ungefleckten *P. formosa*. Außerdem konnte keine Art von Balzverhalten beobachtet werden.

Tabelle 10: Darstellung des Wahlverhaltens der *P. formosa*-Männchen im Vollkontakt. Ausgewertet wurden die Verhaltensweisen Folgen, Nippen und Kopulation(sversuch). Die Primärdaten wurden mit dem Wilcoxon-Test ausgewertet.

STIMULUS 1	STIMULUS 2	Stichprobe	Signifikanz		
			Folgen	Nippen	Kopulation
<i>P. formosa</i>	<i>P. mexicana</i>	N = 6	n.s. (1.000)	n.s. (1.000)	n.s. (1.000)
<i>P. formosa</i>	<i>P. latipinna</i>	N = 6	n.s. (0.813)	n.s. (0.875)	n.s. (0.500)
<i>P. mexicana</i>	<i>P. latipinna</i>	N = 6	n.s. (0.063)	n.s. (0.250)	n.s. (1.000)
<i>P. formosa</i> gefleckt	<i>P. formosa</i> ungefleckt	N = 6	n.s. (0.844)	n.s. (0.625)	n.s. (1.000)

Hybrid-Männchen

Im Vollkontakt stellt sich bei den Hybrid-Männchen das gleiche Bild dar wie in den optischen Wahlversuchen (Tabelle 11). Die Tiere zeigten keinerlei Bevorzugung, außer daß sie ungeflechte *P. formosa* signifikant den gefleckten vorzogen ($p = 0.016$, $N = 7$). Betrachtet man sich die Rohdaten, so kann man sogar von einem regelrechten Vermeiden der gefleckten Weibchen sprechen, da nur 3 der 7 Männchen einem gefleckten Weibchen je einmal gefolgt sind (von 226 registrierten Folgeaktionen), nur einmal das Nippen eines Männchen an einem gefleckten Weibchen beobachtet wurde (von 366 notierten Nippen), aber niemals auch nur ein Männchen einen Kopulationsversuch mit einem gefleckten Weibchen unternommen hat (bei insgesamt 324 beobachteten Kopulationsversuchen). Auch die Hybrid-Männchen zeigten kein Balzverhalten.

Tabelle 11: Darstellung des Wahlverhaltens der Hybrid-Männchen im Vollkontakt. Ausgewertet wurden die Verhaltensweisen Folgen, Nippen und Kopulation(sversuch). Die Rohdaten wurden mit dem Wilcoxon-Test ausgewertet. Grau hinterlegte Felder zeigen signifikante Ergebnisse an.

STIMULUS 1	STIMULUS 2	Stichprobe	Signifikanz		
			Folgen	Nippen	Kopulation
<i>P. formosa</i>	<i>P. mexicana</i>	N = 7	n.s. (0.375)	n.s. (0.813)	n.s. (0.688)
<i>P. formosa</i>	<i>P. latipinna</i>	N = 7	n.s. (0.438)	n.s. (0.109)	n.s. (0.469)
<i>P. mexicana</i>	<i>P. latipinna</i>	N = 7	n.s. (0.938)	n.s. (0.313)	n.s. (0.563)
<i>P. mexicana</i>	Hybrid	N = 7	n.s. (0.688)	n.s. (0.259)	n.s. (0.094)
<i>P. latipinna</i>	Hybrid	N = 7	n.s. (0.219)	n.s. (0.156)	n.s. (0.156)
<i>P. formosa</i> gefleckt	<i>P. formosa</i> ungefleckt	N = 7	** (0.016)	** (0.016)	** (0.016)

Vergleich der beiden Männchen-Typen

Bei dem Vergleich der beiden Männchen-Typen ergaben sich auch im Vollkontakt keine signifikanten Unterschiede, wenn die Männchen zwischen *P. formosa*-, *P. mexicana*- und *P. latipinna*-Weibchen wählen sollten. Allerdings zeigt sich – wie auch bei den optischen Wahlversuchen – ein signifikanter Unterschied bei dem Stimuluspaar *P. formosa* gefleckt – ungefleckt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich des Wahlverhaltens von Hybrid-Männchen und *P. formosa*-Männchen im Vollkontakt. Die Vergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-U Test ausgewertet. Da die Werte zum zweiten Mal zu einer Analyse herangezogen wurden, gilt nach der Bonferroni-Korrektur eine Signifikanzschranke von $p = 0.025$. Grau hinterlegte Felder markieren das Stimuluspaar, bei dem sich signifikante Unterschiede ergeben haben.

STIMULUS 1	STIMULUS 2	Signifikanz		
		Folgen	Nippen	Kopulation
<i>P. formosa</i>	<i>P. mexicana</i>	n.s. (0.445)	n.s. (0.234)	n.s. (0.366)
<i>P. formosa</i>	<i>P. latipinna</i>	n.s. (0.543)	n.s. (0.234)	n.s. (0.628)
<i>P. mexicana</i>	<i>P. latipinna</i>	n.s. (0.234)	n.s. (0.181)	n.s. (0.366)
<i>P. formosa</i> gefleckt	<i>P. formosa</i> ungefleckt	** (0.005)	** (0.001)	** (0.005)

Bei Betrachtung der Rohdaten fiel auf, daß die *P. formosa*-Männchen weniger Kopulationsversuche unternahmen als die Hybrid-Männchen. Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Daten nochmals dahingehend ausgewertet, daß die Kopulationsversuche von Stimulus 1 und 2 nicht subtrahiert, sondern addiert wurden. Daraus ergibt sich dann die Gesamtaktivität der einzelnen Männchen, die dann wiederum innerhalb der beiden Männchen-Gruppen verglichen werden konnte (Tabelle 13). Dabei stellte sich heraus, daß die *P. formosa*-Männchen signifikant weniger Kopulationsversuche unternahmen als die Hybrid-Männchen – zumindest was die Stimuluspaare *P. formosa* – *P. mexicana*, *P. formosa* – *P. latipinna* und *P. mexicana* – *P. latipinna* betrifft. Bei dem Stimuluspaar *P. formosa* gefleckt – ungefleckt besteht nur deshalb kein signifikanter Unterschied in der Kopulationshäufigkeit zwischen *P. formosa*-Männchen und Hybrid-Männchen, weil eines der *P. formosa*-Männchen 400 mal mit einem gefleckten Weibchen zu kopulieren versuchte. Nähme man die Werte dieses Männchens als Ausreißer aus der Analyse, so ergäbe sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0.010$), auch nach Bonferroni-Korrektur des Signifikanzniveaus auf $0.05 / 3 = 0.016$.

Tabelle 13: Vergleich des Wahlverhaltens „Kopulation(sversuch)“ von Hybrid-Männchen und *P. formosa*-Männchen im Vollkontakt. Die Kopulationsversuche jedes Männchens wurden addiert und mit dem Mann-Whitney-U Test ausgewertet. Da die Werte zum dritten Mal zu einer Analyse herangezogen werden, gilt nach der Bonferroni-Korrektur eine Signifikanzschranke von $p = 0.016$. Dunkelgrau hinterlegte Felder markieren die Stimuluspaare, bei denen sich signifikante Unterschiede ergeben haben, hellgraue Felder sind bei Streichen eines Extremwertes signifikant.

STIMULUS 1	STIMULUS 2	Signifikanz Kopulation	
<i>P. formosa</i>	<i>P. mexicana</i>	**	(0.008)
<i>P. formosa</i>	<i>P. latipinna</i>	*	(0.014)
<i>P. mexicana</i>	<i>P. latipinna</i>	**	(0.002)
<i>P. formosa</i> gefleckt	<i>P. formosa</i> ungefleckt	n.s.	(0.101)

5.3.6 Morphologie des Begattungsorgans und seiner akzessorischen Strukturen

Bei allen *P. formosa*-Männchen waren die beschriebenen Strukturen des Gonopodiums und Suspensoriums wie bei den Hybrid- und *P. mexicana*-Männchen gut ausgebildet (Abbildung 49, Abbildung 50).

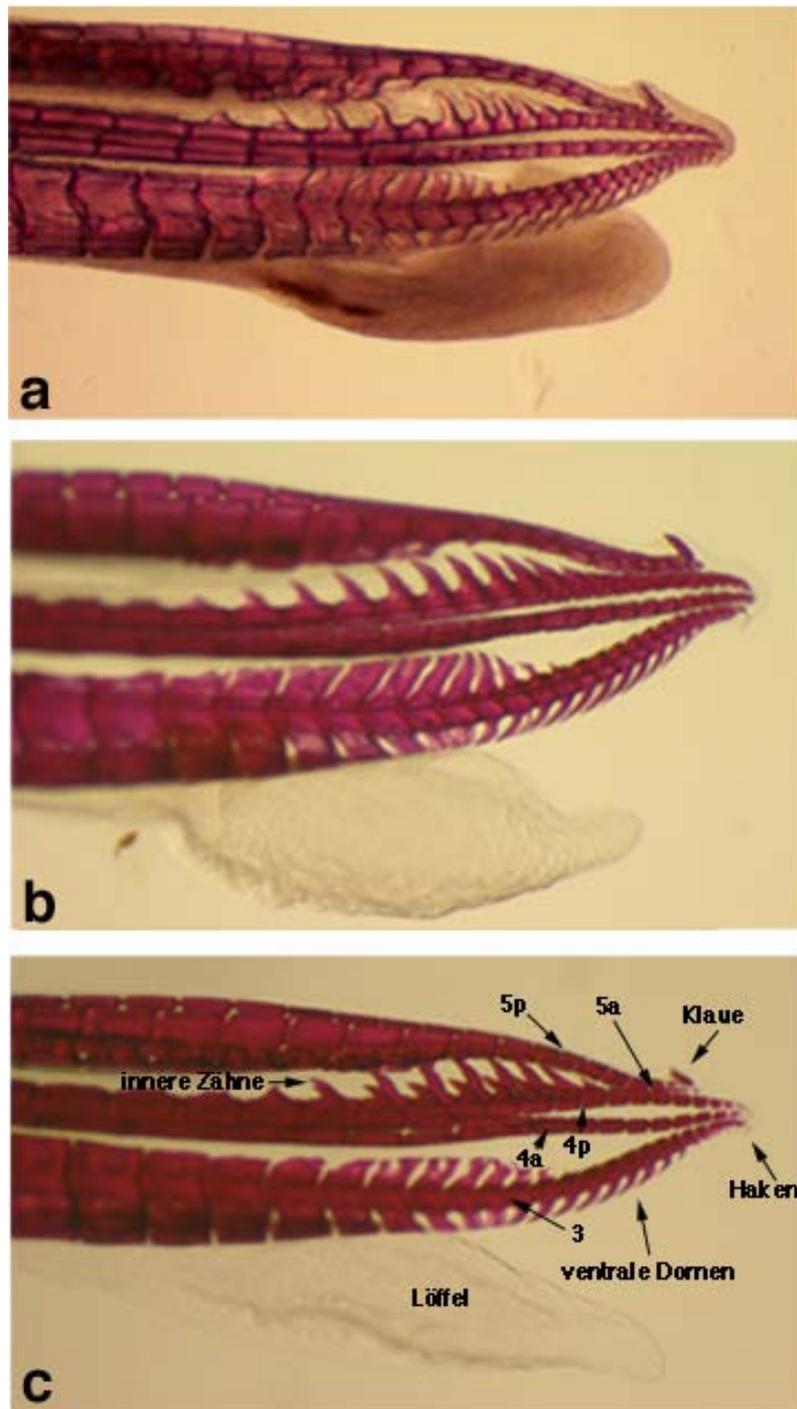


Abbildung 49: Strukturen des Gonopodiums von Poeciliiden im Detail sichtbar gemacht mit der Dawson-Technik. (a) Gonopodium eines *P. formosa*-Männchens. Zum Vergleich das Gonopodium (b) eines Hybrid-Männchens und (c) eines *P. mexicana*-Männchens.

Der Löffel war in unterschiedlicher Größe bei jedem der untersuchten *P. formosa*-Männchen vorhanden. Die knöcherne Klaue am Ende von Strahl 5p war bis auf *P. formosa*-Männchen 4 immer doppelt ausgeprägt. Das Ende des Strahls 4p war leicht nach unten gebogen und die Anzahl der inneren Zähne variierte von 9 bis 12. Alle *P. formosa*-Männchen besaßen ventrale Dornen und 8-11 dorsale Zähne an Strahl 3 sowie einen membranösen Haken. Strahl 6 war stets kürzer als 3, 4 und 5. Das Suspensorium war bei allen *P. formosa*-Männchen vollständig ausgebildet: 2 Gonapophysen dienten als Verbindung von Wirbelsäule und Interhämälplatte, die wiederum über die Baseosten mit dem Gonopodium verbunden waren. Im Gegensatz zu hormonvermännlichten Individuen (Schlupp et al., 1992) war die zur Bewegung des Gonopodiums notwendige Muskulatur wohl bei allen *P. formosa*-Männchen vorhanden, da sie das typische Gonopodialschwingen zeigten, bei dem das Gonopodium wie bei der Kopulation nach vorne geklappt wird (Parzefall, 1969).

Die Hybrid-Männchen wiesen ebenfalls alle einen Löffel auf. Nur Hybrid-Männchen 4 hatte an Strahl 5p eine einfache Klaue, im Gegensatz zu den sonst doppelt ausgebildeten Klauen. Strahl 4p war leicht nach unten geneigt und besaß 9-11 innere Zähne. Ventrale Dornen, 10-12 dorsale Zähne und ein membranöser Haken waren an Strahl 3 vorhanden. Strahl 6 war gegenüber 3, 4 und 5 verkürzt. Das Suspensorium von Hybrid-Männchen 4 zeigte mit 3 Gonapophysen eine Ausnahme gegenüber der sonst zweifach vorhandenen Struktur. Interhämälplatte und Baseosten waren normal ausgebildet.

Die *P. mexicana*-Männchen zeigten neben Löffel und doppelter Klaue an 5p 10-13 innere Zähne an Strahl 4p, dessen Ende ebenfalls leicht nach unten geneigt war. An Strahl 3 zeigten die untersuchten *P. mexicana*-Männchen 8-11 dorsale Zähne, ventrale Dornen und einen membranösen Haken. Strahl 6 war kürzer als 3, 4 und 5. Die 2 Gonapophysen, die Interhämälplatte sowie die Baseosten waren normal ausgebildet.

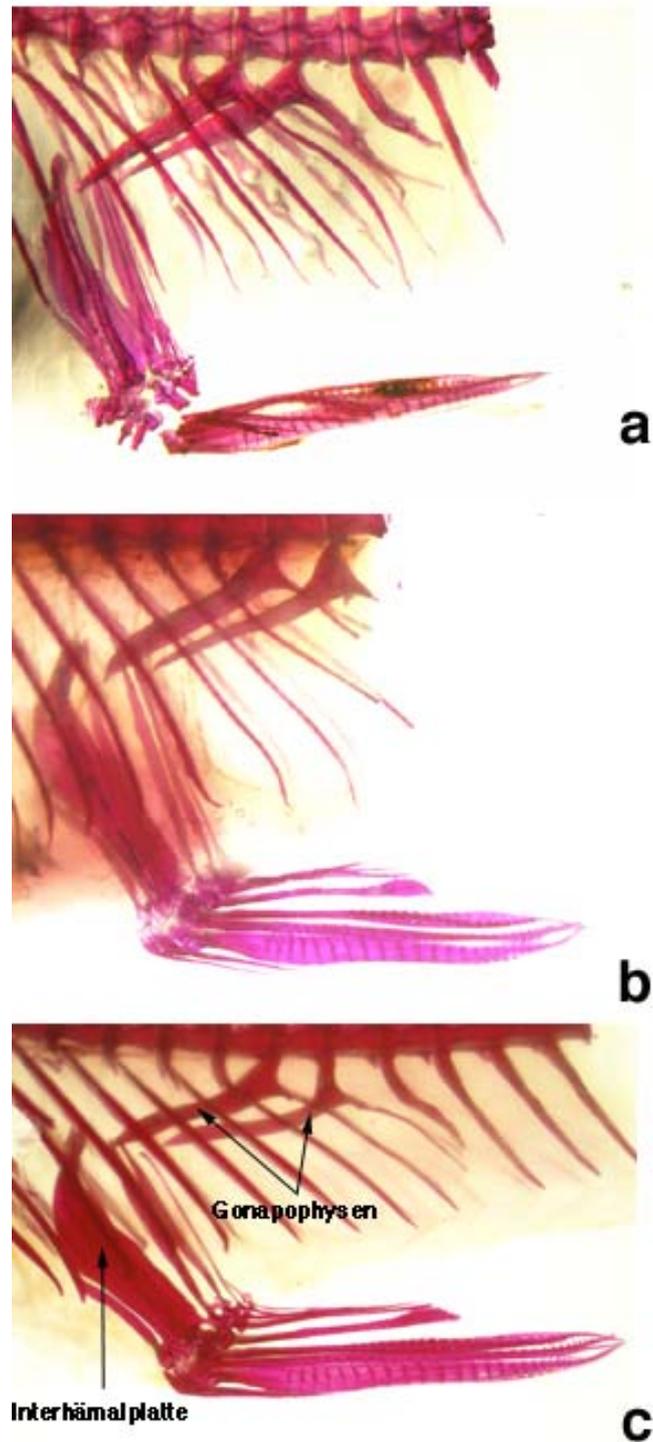


Abbildung 50: Suspensorien und Gonopodien von Poeciliiden nach Anfärbung mit der Dawson-Technik. (a) Suspensorium eines *P. formosa*-Männchens. Zum Vergleich das Suspensorium eines Hybrid-Männchens (b) und eines *P. mexicana*-Männchens (c).

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der variablen morphologischen Merkmale des kompliziert gebauten Begattungsorgans männlicher Poeciliiden dargestellt. Alle anderen Merkmale – wie Ausbildung des Löffels und der Interhämälplatte, ein nach unten gebogenes Ende von Strahl 4, ein gegenüber 3, 4 und 5 verkürzter Strahl 6 sowie die Ausprägung von ventralen Dornen und Haken an Strahl 3 – waren immer bei allen Männchentypen vorhanden.

Tabelle 14: Auswertung der variablen Merkmale des komplex gebauten Befruchtungsorgans bei *P. formosa*-Männchen im Vergleich zu Hybrid-Männchen und *P. mexicana*-Männchen.

Individuum	5p mit Klaue	Innere Zähne an 4p	3 mit dorsalen Zähnen	Gonapo- physen
<i>P. formosa</i> ♂ 3	+ (doppelt)	11 (doppelt)	8	2
<i>P. formosa</i> ♂ 4	+ (einfach)	10 (doppelt)	12	2
<i>P. formosa</i> ♂ 5	+ (doppelt)	9-10 (doppelt)	9	2
<i>P. formosa</i> ♂ 6	+ (einfach)	11 (doppelt)	11	2
<i>P. formosa</i> ♂ 7	+ (doppelt)	12 (doppelt)	10	2
Hybrid ♂ 1	+ (doppelt)	11 (doppelt)	12	2
Hybrid ♂ 3	+ (doppelt)	10 (doppelt)	11	2
Hybrid ♂ 4	+ (einfach)	11 (doppelt)	12	3
Hybrid ♂ 5	+ (doppelt)	9 (doppelt)	12	2
Hybrid ♂ 6	+ (doppelt)	9 (doppelt)	10	2
<i>P. mexicana</i> ♂ 1	+ (doppelt)	10 (doppelt)	9	2
<i>P. mexicana</i> ♂ 2	+ (doppelt)	13 (doppelt)	11	2
<i>P. mexicana</i> ♂ 3	+ (doppelt)	12 (doppelt)	10	2
<i>P. mexicana</i> ♂ 4	+ (doppelt)	10 (doppelt)	9	2
<i>P. mexicana</i> ♂ 5	+ (doppelt)	10 (doppelt)	8	2

5.3.7 Gonadenstruktur

Die Hoden der *P. formosa*-Männchen waren immer paarig angelegt. In den histologischen Schnitten ist zu erkennen, daß zwar Spermatogonien (Sg) und Spermatozyten (Sc) vorhanden sind, aber sich das Chromatin im Vergleich zu *P. latipinna*- und den Hybrid-Männchen nicht weiter kondensiert, wie es für die Spermatisen und reifen Spermatozeugmata typisch ist (Abbildung 51).

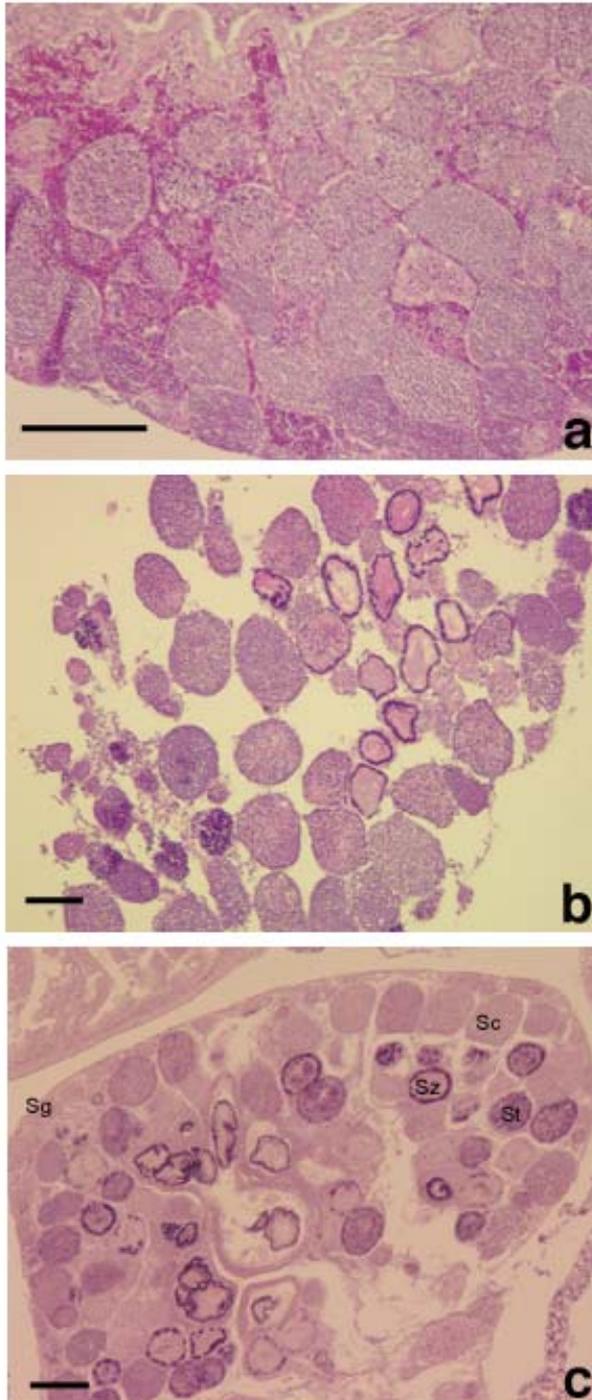


Abbildung 51: HE-Färbung an Paraffinschnitten von Testisgewebe (a) eines *P. formosa*-Männchens. Zum Vergleich Testisgewebe (b) eines Hybrid-Männchens und (c) eines *P. latipinna*-Männchens. Sg = Spermatogonien, Sc = Spermatozyten 1. und 2. Ordnung, St = Spermatisen, Sz = Spermatozeugmata. Der Größenbalken entspricht 100µm.

5.3.8 Paarung meiotischer Chromosomen

Die Analyse des synaptonemalen Komplexes ergab, daß Chromosomen-Paarungen (Synapsis) stattfanden, aber die überwiegende Anzahl an Pachytänzellen Unregelmäßigkeiten zeigten: Univalente, z.T. noch unvollständige Bivalente, abschnittsweise Dreifachpaarungen oder Überkreuzungen (=Interlocks) mit anderen Chromosomen (Abbildung 52).

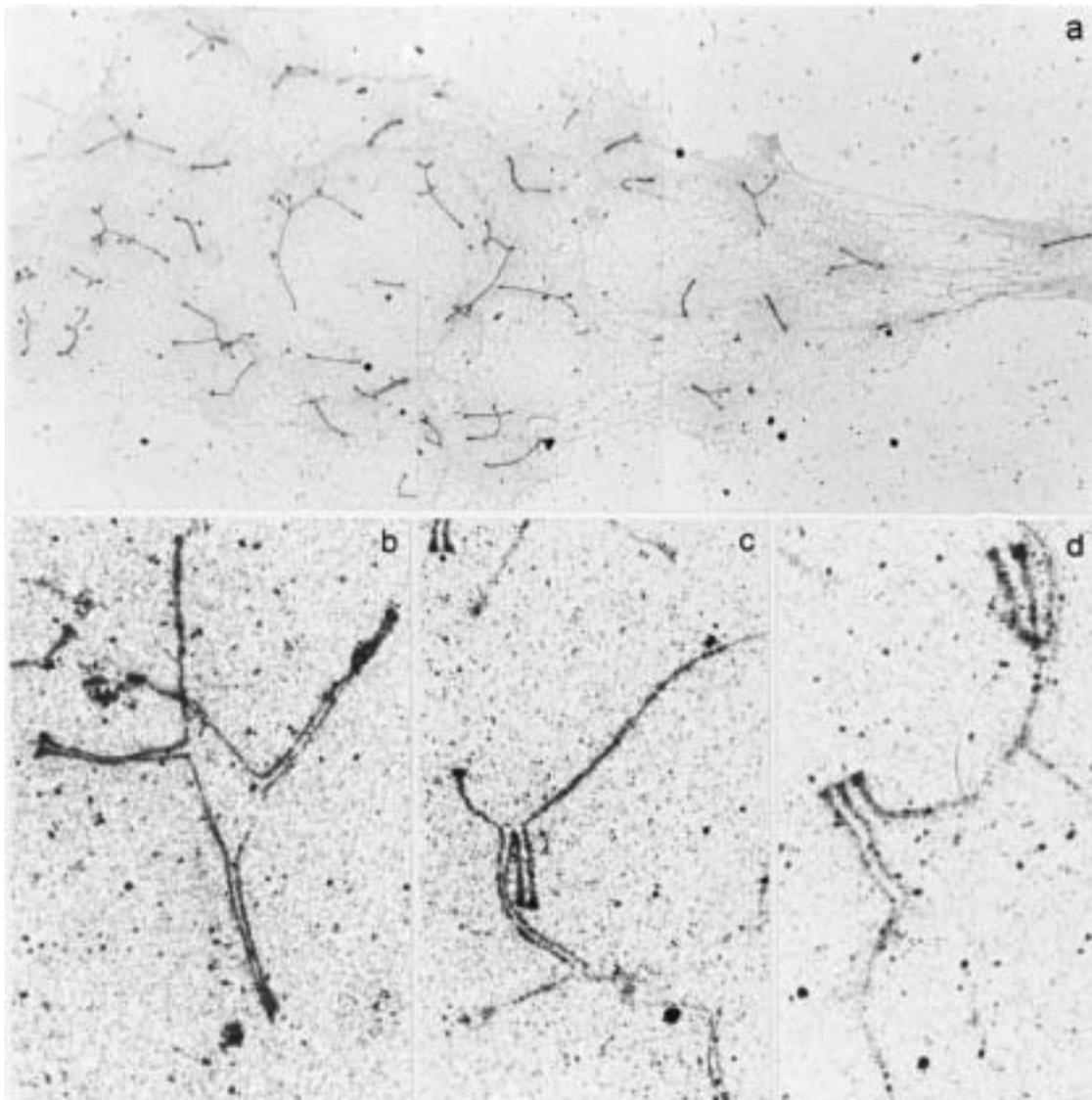


Abbildung 52: Darstellung der Chromosomenpaarung in der Prophase der Meiose I anhand des synaptonemalen Komplexes von *P. formosa*-Männchen im Transmissionselektronenmikroskop. (a) Überblick bei einer Vergrößerung von 1250x bei 60 kV. (b), (c) und (d) zeigen ungewöhnliche Paarungen einzelner Chromosomen in Form von partiellen Einfach-, Doppel- und Dreifach-Strukturen im Detail bei (b) 5000x, 60 kV, (c) 4000x, 60 kV und (d) 5000x, 80 kV.

Im Vergleich zu den *P. formosa*-Männchen wiesen sowohl die Hybrid-Männchen als auch die *P. mexicana*-Männchen 23 vollständig gepaarte Chromosomen auf (Abbildung 53).

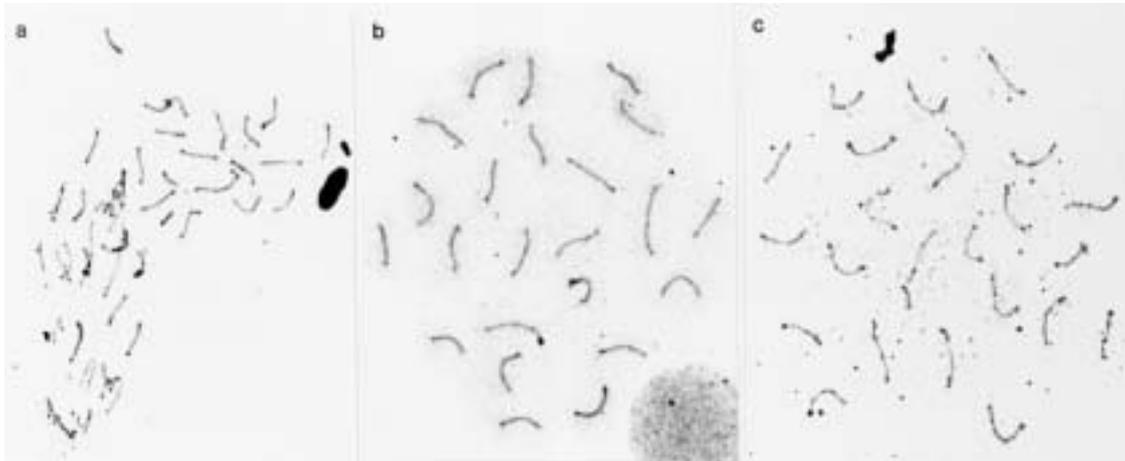


Abbildung 53: Darstellung des synaptonemalen Komplexes im Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 1000x. (a) *P. formosa*-Männchen, (b) Hybrid-Männchen und (c) *P. mexicana*-Männchen.

In der Diakinese, einem späteren Stadium der Prophase I, lassen sich bei den *P. formosa*-Männchen nur noch Bivalente und Univalente erkennen. Diese treten in verschiedenen Zellen in unterschiedlicher Anzahl auf, jedoch immer nahe einer Verteilung von 23 Univalenten zu 23 Bivalenten (= 69 Chromosomen). In 7 ausgewerteten Zellen waren die Proportionen 25:19, 24:22, 23:20, 23:22, 21:22, 24:23, 21:21. Die Abweichungen von den erwarteten 23:23 könnten dadurch entstanden sein, daß fälschlicherweise ein Bivalent als zwei Univalente interpretiert wurde. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß die Mikrochromosomen auch als Univalente gezählt wurden, da sie in diesem Stadium aufgrund der starken Kondensierung der Chromosomen nicht identifiziert werden konnten. Die Hybrid- und *P. mexicana*-Männchen hingegen zeigten auch hier die erwarteten 23 Bivalente (Abbildung 54).

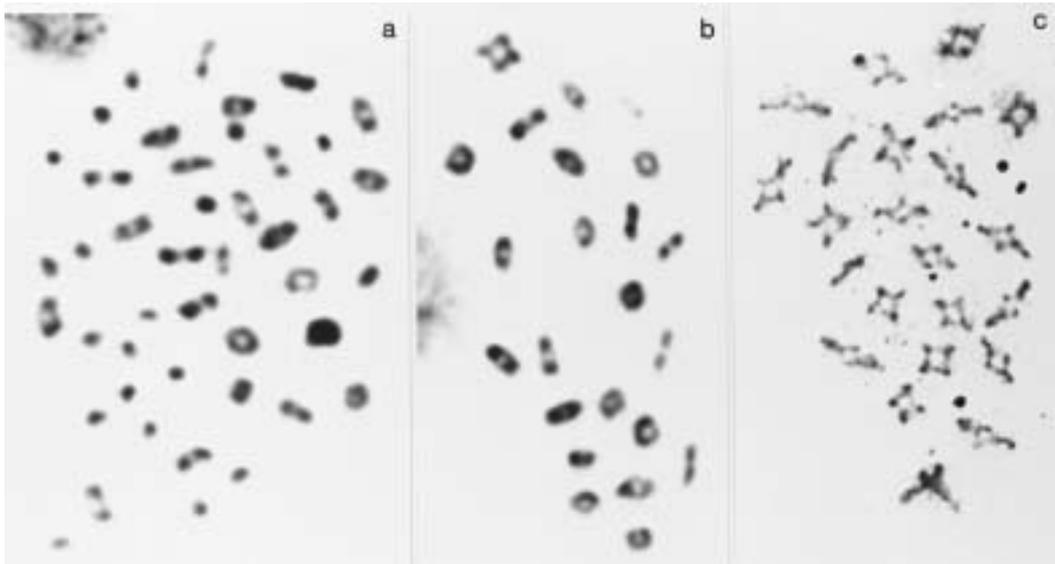


Abbildung 54: Meiose-Chromosomen im Diakinesestadium von (a) einem *P. formosa*-Männchen, (b) einem Hybrid-Männchen und (c) einem *P. mexicana*-Männchen. Lichtmikroskopische Aufnahme bei einer Vergrößerung von 1000x.

5.3.9 Fertilität der *P. formosa* Männchen

Drei der *P. formosa*-Männchen (# 3, # 5, # 7) produzierten Nachwuchs (N = 4, 56, 33) mit gefleckten *P. formosa*-Weibchen (Tabelle 15), aber nicht mit ungefleckten *P. formosa*-Weibchen oder *P. mexicana*-Weibchen. Alle Nachkommen waren Weibchen.

Tabelle 15: Anzahl der Nachkommen gefleckter *P. formosa*-Weibchen pro Wurf, die mit einem der *P. formosa*-Männchen angepaart waren.

♂	Anzahl der Nachkommen pro Wurf	Ploidiegrad der Nachkommen	Stichprobe
<i>P. formosa</i> ♂3	4	2n	N = 4
<i>P. formosa</i> ♂5	1 / 3 / 3 / 3 / 4 / 3 / 2 / 6 / 7 / 5 / 1 / 7 / 6 / 5	2n	N = 13
<i>P. formosa</i> ♂7	11 / 6 / 4 / 4 / 6 / 2	2n	N = 22
∅	4.43 ± 4.12		Σ = 39

Im Vergleich dazu hatten die mit *P. mexicana*-Männchen angepaarten, gefleckten Weibchen der Stammpopulation im Durchschnitt 6.48 ± 4.12 Nachkommen pro Wurf (N = 60). Die Wurfgrößen dieser gefleckten Weibchen unterschieden sich demnach signifikant ($p = 0.026$, Mann-Whitney U) voneinander, je nachdem, ob sie mit *P. formosa*-Männchen oder mit *P. mexicana*-Männchen angepaart wurden. Die durchflußzytometrische Untersuchung ergab, daß alle analysierten Töchter der *P. formosa*-Männchen diploid waren (N = 39, Tabelle 15).

Anhand des DNA-Fingerprints zeigte sich, daß sämtliche analysierten Töchter mit ihren Müttern genetisch identisch waren (Abbildung 55). Demnach haben die *P. formosa*-Männchen, die Nachwuchs mit gefleckten, gynogenetischen *P. formosa*-Weibchen produziert haben, keinen nachweisbaren genetischen Beitrag zur F₁-Generation geleistet.

5.3.10 Herkunft des dritten Genoms

Da die Chromosomen der *P. formosa*-Männchen alle akrozentrisch sind und nur willkürlich nach Größe geordnet werden können, konnte anhand von konventionellen Chromosomenfärbungen keine Aussage über die Herkunft des dritten Chromosomensatzes getroffen werden. Das dritte Haplom könnte entweder aus einer Genomduplikation hervorgegangen sein (Autotriploidie), oder aber es könnte paternalen Ursprungs sein (Allotriploidie). Zur Beantwortung der Frage nach der Herkunft des dritten Chromosomensatzes wurde ein Multilocus-Fingerprint mit den Oligonukleotid-Sonden (GGAT)₄ (Abbildung 55) und (GATA)₄ (nicht abgebildet) angefertigt. Daraus geht hervor, daß alle *P. formosa*-Männchen zusätzliche Banden zu dem klonalen Bandenmuster ihrer Schwestern und Töchter aufweisen. Die Männchen 3, 4, 5 und 6 zeigten eine zusätzliche Bande von etwa 6.4 kb, während Männchen 7 zwei zusätzliche Banden von 6.8 und 8.0 kb aufwiesen (GGAT)₄. Im Autoradiogramm nach Hybridisierung mit der Oligonukleotid-Sonde (GATA)₄ zeigten die *P. formosa*-Männchen 3 bis 6 je eine zusätzliche Bande von ca. 10 kb. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die *P. formosa*-Männchen allotriploid und nicht autotriploid sind.

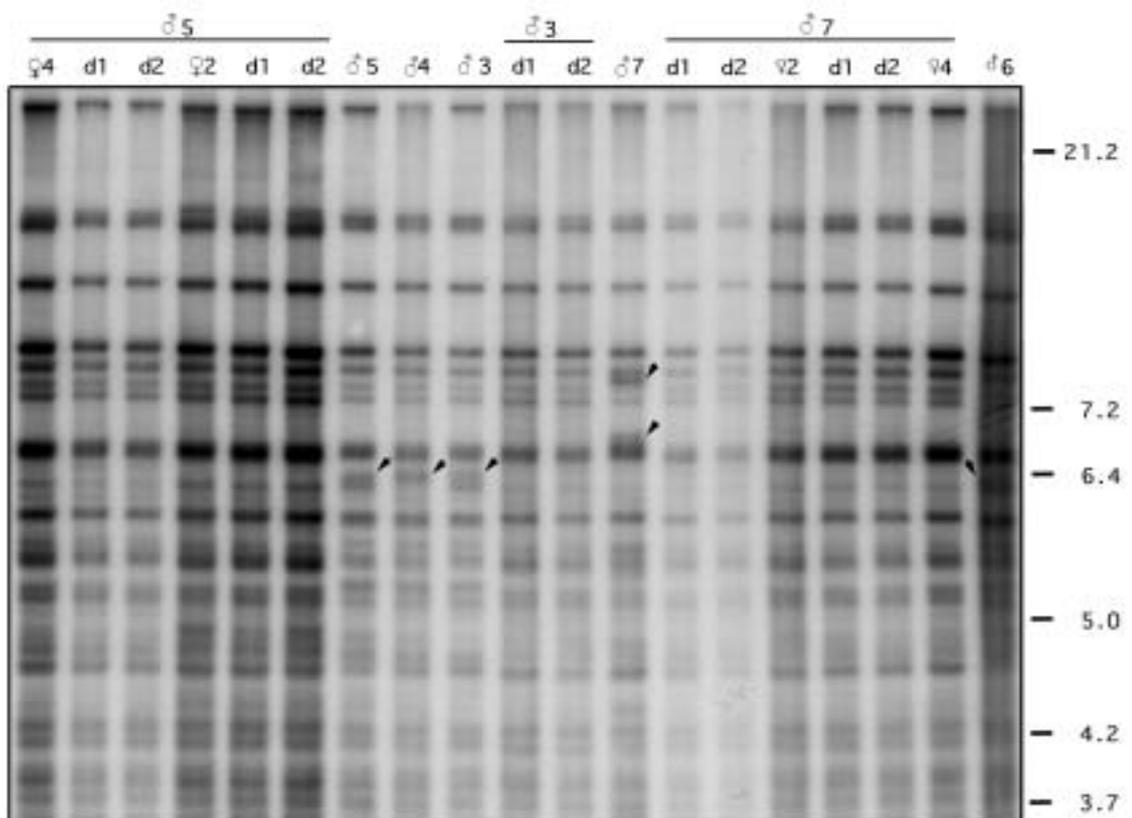


Abbildung 55: Multilocus DNA-Fingerprint der *P. formosa*-Männchen 3-7, von gefleckten *P. formosa*-Weibchen sowie deren Nachkommen mit den *P. formosa*-Männchen nach Hybridisierung mit der Oligonukleotid-Sonde (GGAT)₄. Zusätzliche Banden im Vergleich zum klonal vererbten Bandenmuster der Weibchen sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet.

5.4 Diskussion

Schon 1932 haben Hubbs & Hubbs (1932) beobachtet, daß manche *P. formosa*-Weibchen „abnormale“ Nachkommen mit schwarzen Flecken hervorbringen, die sich zu Männchen umwandelten. Leider gibt es – wie auch bei anderen Berichten von spontan auftretenden *P. formosa*-Männchen (Tabelle 16) – keinerlei Information über deren nukleären DNA-Gehalt. Haskins et al. (1960) vermuteten allerdings schon, daß die Ausbildung eines phänotypischen Männchens unter zwanzig Jungfischen auf die Introgression paternaler Chromosomen zurückzuführen sein könnte. Erst in jüngster Zeit wurde der DNA-Gehalt männlicher *P. formosa* berücksichtigt (Döbler, 1998). Allein Rasch et al. (1965) berichten über einen triploiden Hybrid aus *P. formosa* x *P. vittata*, der eine männliche Morphologie mit ausgeprägter Testisstruktur ausgebildet hatte, allerdings keine reifen Spermatozoa aufwies. Auch hier wies das Pigmentmuster auf paternale Introgression hin.

Das seltene, aber doch regelmäßige Auftreten von nahezu funktionellen triploiden Männchen in dem als reine Weibchenart beschriebenen Amazonenkärpfling könnte dazu beitragen, die immer noch wenig verstandenen geschlechtsdeterminierenden Faktoren bei der Gattung *Poecilia* aufzuklären.

5.4.1 Triploidie und ihre Folgen für die Meiose

Wie in Kapitel 2 beschrieben ist Triploidie sowohl aus natürlichen Lebensräumen (Schultz & Kallman, 1968; Strommen et al., 1975b; Lamatsch et al., in Vorbereitung) als auch aus dem Labor (Nanda et al., 1995) bekannt. Allerdings waren alle bisher beschriebenen triploiden Individuen, die unter Laborbedingungen entstanden sind, steril und bis auf eine Ausnahme (Rasch et al., 1965) Weibchen. Im Gegensatz dazu sind die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Männchen fertil, zumindest was das Auftreten reifer Spermien, deren Morphologie und Motilität betrifft. Sie induzierten sogar gynogenetisch Nachwuchs mit *P. formosa*-Weibchen, zeugten jedoch niemals Nachkommen mit sexuellen *P. mexicana*-Weibchen. Die Spermien waren offensichtlich hinreichend, um die gynogenetische Entwicklung der Embryonen bei *P. formosa*-Weibchen auszulösen, aber nicht, um die haploiden Oozyten sexueller Weibchen zu befruchten. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, daß der durchschnittliche DNA-Gehalt der Spermien von 1.48 pg (bei errechneten 100 %) über dem errechneten haploiden Wert (0.98 pg/Nukleus), aber unter dem errechneten diploiden (1.96 pg) bzw. triploiden Wert liegt. Demnach

findet eine Form der Reduktionsteilung der 69 Chromosomen in der männlichen Meiose statt. Da die Messungen aber eine deutlich größere Streuung der Werte zeigten als bei den Messungen an Hybridspermien (CV% 18.96 gegenüber 4.62), könnte dies darauf hinweisen, daß ein Großteil der produzierten Spermien der *P. formosa*-Männchen aneuploid sind.

Tabelle 16: Bisher in der Literatur beschriebene, spontan aufgetretene *P. formosa*-Männchen. T steht für Testes, O für Ovarien. Die mit * gekennzeichnete Anzahl an Männchen schließt die Veröffentlichungen von Haskins et al. (1960) und Kallman (1962b) mit ein.

Referenz	Anzahl	Gonaden	Männl. Sexualverhalten	Nachkommen	Ploidie-Grad	Herkunft
Hubbs & Hubbs, 1932	?	?	?	—	?	Río Papaloapan (Mx)
Hubbs et al., 1959	1	T	?	—	?	Brownsville (Tx)
Haskins et al., 1960	1	?	?	+ (<i>P.f.</i> ♀)	?	Brownsville (Tx)
Kallman, 1962b	2	?	ja	—	?	San Marcos River (Tx)
Hubbs, 1964	31*	T, O, verkümmert	einige ja	—	?	Brownsville + San Marcos River (Tx)
Rasch et al., 1965	1	T	?	—	?	?
Darnell & Abramoff, 1968	3	T, verkümmert	?	1 + (<i>P.f.</i> ♀), 2 —	?	Río Tamesí, Río Guayalejo (Mx), Olmito (Tx)
Rasch et al., 1970	2	Verkümmert	+	—	3n	Olmito (Tx), Río Guayalejo (Mx)
Döbler, 1998	1	O	?	?	2n	Río Purificación (Mx)
Döbler, 1998	24	T	+	+ (<i>P.f.</i> ♀)	2n	Río Purificación (Mx)

Eine weitere Möglichkeit, warum *P. formosa*-Männchen keine sexuellen Weibchen befruchten konnten, wäre, daß die Spermien nicht die nötige Ausstattung an Centrosomen mitbringen, die für die erste mitotische Teilung nötig sind (Moomjy et al., 1999). Das Auslösen der Embryogenese bei *P. formosa*-Weibchen sollte demnach möglich, da diese ihre Gameten ameiotisch produzieren, und somit die Centrosomen nicht verlorengelangen.

Ebenso könnten aber auch wichtige Gene, die für die Embryonalentwicklung notwendig sind, nicht mehr funktionstüchtig sein. Hill et al. (1989) haben bei *C. elegans* herausgefunden, daß eine loss-of-function Mutation in dem Spe-11 Gen des Männchens einen letalen Phänotyp verursacht. Das Produkt, für das dieses Gen codiert, ist normalerweise in Spermien vorhanden und scheint die Initiierung der Embryogenese zu beeinflussen.

Zwei Tatsachen weisen auf Anomalien bei der Produktion der Gameten hin:

- 1) Die Auswertung der Testisschnitte zeigt, daß im Vergleich zu den Testisgeweben von Hybrid- und *P. mexicana*-Männchen die späten Reifestadien 3 und 4 (Spermatiden und Spermatozeugmata) fehlen – obwohl ausreichend Spermatogonien und primäre und sekundäre Spermatozyten vorhanden waren.
- 2) Die Wurfgrößen von den gefleckten Weibchen, die mit den *P. formosa*-Männchen kopuliert hatten, waren signifikant niedriger als bei der Stammpopulation, die mit *P. mexicana*-Männchen angepaart wurde.

Beides läßt eine Hypospermie der *P. formosa*-Männchen vermuten.

Die Schwierigkeiten bei der Meiose, drei Chromosomensätze auf zwei Tochterzellen aufzuteilen, werden offensichtlich, wenn man die Paarung der Chromosomen in der Prophase der Meiose I (SC) analysiert. Trotz der Formation von irregulären Strukturen wie Dreifachpaarungen oder der Beteiligung von mehreren Chromosomen an einer Paarungsstruktur scheinen sich überwiegend Bivalente und Univalente zu annähernd gleichen Teilen zu bilden. Bei der Reduktionsteilung bleibt es dem Zufall überlassen, in welche der Tochterzellen die Univalente gelangen. Die Wahrscheinlichkeit, daß aneuploide Spermien gebildet werden, ist daher sehr hoch. Das würde auch den ausbleibenden Reproduktionserfolg der *P. mexicana*-Weibchen erklären.

Trotz der Tatsache, daß bei den *P. formosa*-Männchen eine Paarung der Chromosomen stattfindet, bedeutet dies noch nicht zwingend, daß Crossing-over stattfindet (Rasmussen, 1977). Dennoch sind bei den *P. formosa*-Männchen wesentliche Merkmale sexueller Reproduktion (Synapsis, Segregation) vorhanden.

5.4.2 Morphologie

Morphologisch bestehen keine großen Unterschiede zwischen den *P. formosa*- und den Vergleichsmännchen. Neben den typisch männlichen Körperproportionen und der z.T. gelblichen Färbung der Flossen weisen alle *P. formosa*-Männchen ein vollständig ausgebildetes Gonopodium auf. Die Anzahl der inneren Zähne an 4p divergierte zwischen aber auch innerhalb der verschiedenen Männchen-Typen: Die *P. formosa*-Männchen wiesen 9-12 Segmente mit doppelter Bezahnung auf, die Hybrid-Männchen 9-11 und die *P. mexicana*-Männchen 10-13. Diese Zahlen weichen geringfügig von den Daten von Dramsch (1977) bzw. Döbler (1998) ab, die für *P. formosa*-Männchen 8-9 Segmente mit inneren Zähnen und bei *P. mexicana*-Männchen 11 bzw. 9-10 bestimmten.

Die ventralen Dornen am Flossenstrahl 3, die alle der untersuchten Männchen aufwiesen, wurden von Rosen & Bailey (1963) als typisches Merkmal der Gattung *Poecilia* und von Döbler (1998) für spontan-vermännlichte *P. formosa* beschrieben.

Auch die Anzahl an dorsalen Zähnen an Flossenstrahl 3 variierte zwischen den Gruppen sowie innerhalb der Gruppen. Während die *P. formosa*-Männchen 9-12 dorsale Zähne aufwiesen, zeigten die Hybrid-Männchen 10-12 und die *P. mexicana*-Männchen 9-11. Alle anderen Merkmale wie Löffel, knöchernen Klaue an 5p, membranöser Haken an 3 waren bei allen untersuchten Männchen in ähnlicher Form und Größe ausgebildet. Da auch alle untersuchten *P. formosa*-Männchen 2 Gonapophysen und eine Interhämälplatte ausgebildet hatten, handelt es sich anhand der morphologischen Daten um vollständig entwickelte Männchen.

5.4.3 Sexualverhalten

Anhand der Verhaltensanalysen ergaben sich zunächst ebenfalls keine Unterschiede zwischen *P. formosa*-Männchen und Hybrid-Männchen.

Während in den optischen Wahlversuchen beide Männchen-Typen keine Bevorzugung zeigten, wenn sie die Wahl zwischen *P. formosa*-, *P. mexicana*- und

P. latipinna-Weibchen hatten, so zeigten sie doch beide – nach Ausschluß von „Ausreißern“ – eine signifikante Bevorzugung für das Männchen in gemischtgeschlechtlichen Stimuluspaaren. Im Vergleich der beiden Männchen-Typen ergaben sich somit keine signifikanten Unterschiede. Die Bevorzugung der Männchen für andere Männchen muß wohl als Aggressionsverhalten interpretiert werden, da sich das Sexualverhalten normalerweise auf potentielle Paarungspartner richtet, und somit die Weibchen bevorzugt werden sollten. Allerdings konnten Balsano et al. (1985) zeigen, daß dominante Männchen 63 % ihrer Aktivitäten auf andere Männchen richteten, und nur 37 % auf Weibchen, während rangniedrige Männchen den Weibchen mehr Aufmerksamkeit schenkten. Da sowohl die *P. formosa*-Männchen als auch die Hybrid-Männchen einzeln bzw. ohne andere Männchen gehalten wurden, kann angenommen werden, daß sie dominante Verhaltensstrukturen zeigten.

Die Hybrid-Männchen hatten zusätzlich die Wahl zwischen ihren „arteigenen“ Hybrid-Weibchen und den Weibchen der anderen Arten. Auch hier gab es keine signifikante Bevorzugung. Evtl. konnten die Hybrid-Männchen die Hybrid-Weibchen gar nicht von *P. formosa*-Weibchen unterscheiden (siehe auch Dries, 1998), was aber bei dem „allgemeinen Nicht-Wählen“ der Männchen nicht nachzuweisen war.

Signifikante Unterschiede im Wahlverhalten der beiden Männchen-Typen ergaben sich nur bei dem Stimuluspaar *P. formosa* gefleckt – *P. formosa* ungefleckt. Die Hybrid-Männchen hielten sich signifikant häufiger vor den ungefleckten *P. formosa*-Weibchen auf bzw. interagierten signifikant häufiger mit den ungefleckten *P. formosa*-Weibchen. Die Rohdaten geben Aufschluß darüber, daß es sich dabei schon um ein Vermeiden der schwarz-gefleckten Weibchen handeln könnte.

Die *P. formosa*-Männchen hingegen zeigten weder in optischen Wahlversuchen noch in Vollkontakten eine signifikante Bevorzugung, tendierten aber eher zu den gefleckten Weibchen. Die Bevorzugung für gefleckte Weibchen war jedoch anscheinend größer, als aus den Verhaltensversuchen zu schließen war. Die *P. formosa*-Männchen „zeugten“ nämlich ausschließlich Nachkommen mit gefleckten, gynogenetischen *P. formosa*-Weibchen. Wie es zu diesem Unterschied im Wahlverhalten der beiden Männchen-Typen kommt, kann nicht endgültig geklärt werden.

Landeau & Terborgh (1986) und Theodorakis (1989) stellten fest, daß phänotypisch andersartige Individuen in einem Schwarm einem höheren Prädationsrisiko ausgesetzt sind (= oddity effect). Demnach sollte sich ein Individuum – wenn es die Wahl hat – für die Gesellschaft von Tieren entscheiden, denen es stärker ähnelt. In

einer Studie an hellen und dunklen *P. latipinna* fanden McRobert & Bradner (1998) tatsächlich heraus, daß sich einzelne Tiere immer zu der Gruppe gesellten, deren Körperfärbung der ihren ähnlicher war. Das ist, was wir bei den beiden Männchen-Typen beobachten können: Die hellen Hybrid-Männchen bevorzugten signifikant helle *P. formosa*-Weibchen, während die gefleckten *P. formosa*-Männchen tendentiell die gefleckten Weibchen bevorzugten. Ob die o.g. Gründe allerdings auch bei der Wahl des Sexualpartners eine Rolle spielen, ist unklar. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß die Tiere einen ihnen vertrauten Stimulus wählen. Da die *P. formosa*-Männchen – im Gegensatz zu den Hybrid-Männchen – sowohl mit gefleckten als auch ungefleckten Tieren aufgewachsen sind, könnte Erfahrung die Partnerwahl beeinflussen (Magurran et al., 1994).

Die Wahl zwischen gefleckten und ungefleckten *P. formosa*-Weibchen stellt also den einzigen signifikanten Unterschied im Vergleich der beiden Männchen-Typen bezüglich der Partnerwahl dar. Da es sich dabei nicht um eine qualitative Aussage über die „Güte“ der Männchen handelt, sind die *P. formosa*-Männchen demnach als „echte“ Männchen einzustufen. Allerdings könnten sehr feine Unterschiede bei einer Stichprobengröße von 6 bzw. 7 evtl. nicht aufgelöst werden. Daher sollen alle in Zukunft entstehenden *P. formosa*-Männchen ebenfalls in standardisierten Verhaltensversuchen getestet werden, um den Stichprobenumfang zu erhöhen.

Einen deutlichen Unterschied ergab jedoch das Kopulationsverhalten der beiden Männchen-Typen: Die *P. formosa*-Männchen unternahmen signifikant weniger Kopulationsversuche als die Hybrid-Männchen. Diese deutlich verringerte sexuelle Motivation könnte evtl. auf verringerten Hormonwerten zurückzuführen sein. Verschiedenen Untersuchungen haben ergeben, daß 11-Ketotestosteon (11-KT) bei Fischen eine wichtige Rolle bei der Auslösung des männlichen Reproduktionsverhaltens spielt (Borg, 1987; Brantley et al., 1993). Da 11-KT ebenfalls bei der Spermatogenese eine Rolle spielt, indem es die Sertoli-Zellen stimuliert (Miura et al., 1991), könnte ein niedriger Spiegel auch die Reifung der Gameten beeinflussen.

5.4.4 Geschlechtsdeterminierung bei Vertebraten

Im Gegensatz zu dem hochentwickelten Dimorphismus der Geschlechtschromosomen von Säugern (XX / XY) und Vögeln (ZW / ZZ) konnten in den meisten bisher analysierten Fischarten keine heteromorphen Geschlechtschromosomen

identifiziert werden. Von den ca. 1000 Knochenfischarten, deren Karyotyp untersucht wurde, weisen nur etwa 10% morphologisch unterscheidbare Geschlechtschromosomen auf (Morescalchi, 1992). Bei der Gattung *Poecilia* konnten primitive Geschlechtschromosomen bei *P. sphenops* var. *melanistica* (Black Molly) und *P. reticulata* (Guppy) nachgewiesen werden (Nanda et al., 1990).

Die Haldane-Regel (Haldane, 1922) besagt, daß das Geschlecht, das infolge einer interspezifischen Hybridisierung gänzlich wegfällt, rarer wird oder aber steril ist, das heterogametische Geschlecht ist. Aufgrund des schwierigen zytologischen Nachweises von Geschlechtschromosomen in Fischen (Rishi, 1989; Sola et al., 1997), schien das Auslösen von Gynogenese und das anschließende Beobachten des Geschlechterverhältnisses eine verlässliche Methode zu sein, um Männchen oder Weibchen als das heterogametische Geschlecht zu identifizieren. Die Induktion von Gynogenese beinhaltet zwei Schritte: (1) Aktivierung der Oozyte mit Spermien, deren DNA durch UV zerstört wurde und (2) Wiederherstellung des diploiden Status durch einen Druck- bzw. Temperaturschock. Durch den Schock kann entweder die zweite meiotische Teilung (meiotische Gynogenese) oder die erste mitotische Teilung der Zygote unterbunden werden. In den meisten der 27 verlässlichen Studien über induzierte Gynogenese waren die Männchen heterogametisch (Pandian & Koteeswaran, 1998). Demzufolge würde man in diesen Arten zu 100% weiblichen Nachwuchs erwarten. Allerdings treten z.T. deutliche Abweichungen von diesem Erwartungswert auf. Eine ganze Reihe an Veröffentlichungen beschäftigt sich mit dem unerwarteten Auftreten von Männchen in diesen Arten. Als Gründe werden (1) paternale Introgression (Volckaert et al., 1994; Carter et al., 1991), (2) eine mögliche Präsenz autosomaler geschlechtsbestimmender Gene (Komen & Richter, 1990; Mair et al., 1991; Komen et al., 1993), und/oder (3) Umwelteinflüsse wie Veränderungen in Temperatur, pH-Wert und Populationsdichte (Döbler, 1998; Castelli, 1994; Tabata, 1995) angeführt.

Bei den meisten Tieren wird das Geschlecht eines Individuums durch seinen Genotyp (GSD = genetic sex determination) bestimmt, bei einigen Arten allerdings durch bestimmte Umweltbedingungen (ESD = environmental sex determination). Hier wären bestimmte Reptilien (Pieau et al., 1999), Amphibien (Wallace et al., 1999) und Fische (Conover & Heins, 1987; Baroiller et al., 1999) zu nennen. Wie kann es denn aber bei *P. formosa* zu der beobachteten Geschlechtsumkehr kommen?

5.4.5 Geschlechtsdeterminierung bei *P. formosa*

Wir wissen nicht, was die Gründe für das Entstehen der von Hubbs et al. (1959) beschriebenen männlichen *P. formosa* in natürlichen Habitaten sind. Bei den im Labor entstandenen Männchen, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden, liegt sicherlich kein ESD vor, da sich keines der anderen Tiere in dem jeweiligen Becken zu dieser Zeit umgewandelt hat. Diese Männchen weisen zwei unabhängige Ereignisse paternaler Introgression auf. Als Folge davon besitzen sie gleichzeitig drei Chromosomensätze und 2 bis 3 Mikrochromosomen pro Zellkern. Diese Mikrochromosomen beinhalten den Makromelanophoren-Locus (Schartl et al., 1995b; 1997), der eine Region repräsentiert, die homolog zu dem subterminalen Ende der Geschlechtschromosomen von *Xiphophorus maculatus* ist. Bekanntermaßen beinhaltet diese Region die Gene für die Geschlechtsdeterminierung (Gutbrod & Schartl, 1999). Allerdings kann die Anwesenheit der Mikrochromosomen allein die Entstehung von männlichen Individuen nicht erklären, da keiner der diploiden Mikrochromosomen-Träger jemals einen männlichen Phänotyp ausgebildet hat. Aber auch der triploide Chromosomensatz kann nicht alleine eine Geschlechtsumkehr bewirken, da alle bisher gefundenen triploiden Individuen Weibchen waren. Auch Freilandfänge, die neben drei Chromosomensätzen noch ein Mikrochromosom aufwiesen, zeigten keine Anzeichen von Geschlechtsumkehr (siehe Kapitel 4). Die Tatsache, daß sowohl die von Hubbs & Hubbs (1932) gefundenen Männchen abnormale schwarze Flecken aufwiesen, als auch das triploide Männchen bei Rasch et al. (1965) das Pigmentmuster von *Limia vittata* aufwies, deutet darauf hin, daß vielleicht nur dann eine Geschlechtsumkehr des ansonsten rein weiblichen Amazonenkärpflings stattfinden kann, wenn die Gene des Geschlechtsbestimmungs-Locus auf den Mikrochromosomen mit den Genen eines zusätzlichen geschlechtsdeterminierenden Genorts auf dem dritten Haplo zusammenwirken.

5.4.6 Theorie zur Entstehung triploider männlicher Tiere bei *P. formosa*

Entstehung von *P. formosa*

Es wurden bereits einige Versuche unternommen, durch Kreuzung der vermuteten Elternarten einen unisexuellen Hybriden zu erzeugen (Hubbs & Hubbs, 1946b; Hubbs & Hubbs, 1946a; Prehn & Rasch, 1969; Turner et al., 1980; Schlupp, 1995). Allerdings waren alle erhaltenen Hybriden bisexuell. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß wahrscheinlich nicht die „richtigen“ Populationen zur

Nachzucht verwendet wurden, da die Entstehung von *P. formosa* offensichtlich ganz besondere Voraussetzungen hinsichtlich des Genotyps der Elternarten und der Kombination von Erbanlagen in den F₁-Bastaren verlangt.

Die eingeschlechtlichkeit von *P. formosa* könnte auf dem Zusammentreffen zweier unterschiedlicher Geschlechtsbestimmungsmechanismen beruhen.

Angenommen *P. latipinna* wiese Geschlechtschromosomen auf, bei denen das Männchen heterogametisch (XY) und das Weibchen homogametisch (XX) ist, *P. mexicana* hingegen würde einen WZ / ZZ-Mechanismus aufweisen. Es würden folgende Gameten produziert, die bei einer Kreuzung zu folgenden Genotypen führten:

P. mexicana-Weibchen (WZ) x
P. latipinna-Männchen (XY):

P. latipinna-Weibchen (XX) x
P. mexicana-Männchen (ZZ):

		<i>P. mex</i> ♀	
		W	Z
<i>P. lat</i> ♂	X	WX ♀	ZX ♀?
	Y	WY ♀	ZY ♂

		<i>P. lat</i> ♀	
		X	
<i>P. mex</i> ♂	X	ZX	
	Z	♀?	

Da es keine Versuche zu Kreuzungen von Individuen mit den zwei verschiedenen Geschlechtsbestimmungsmechanismen (XX/XY und ZW/ZZ) innerhalb einer Gattung gibt, bleibt nur zu spekulieren, welches Geschlecht ein Organismus mit dem Genotyp ZX hat. In einem vor kurzem veröffentlichten Übersichtsartikel über die Evolution von Geschlechtschromosomen bei Vögeln (Ellegren, 2000) werden Beispiele angeführt, die darauf hindeuten, daß zwei Z-Chromosomen vorhanden sein müssen, um den männlichen Phänotyp auszulösen (Haploinsuffizienz). Demzufolge sollte ein Individuum mit dem Genotyp ZX weiblich sein. Demnach würden bei der Kreuzung *P. mexicana* (= Mutter) x *P. latipinna* (= Vater) sowohl weibliche (WX, WY, ZX) als auch männliche Tiere (ZY) in einem Verhältnis von 3:1

entstehen, während bei der Kreuzung *P. latipinna* (= Mutter) x *P. mexicana* (= Vater) nur ein möglicher Genotyp resultierte (ZX).

Nimmt man dagegen an, daß *P. mexicana* einen XX / XY-Mechanismus aufweist, *P. latipinna* hingegen einen ZZ / ZW-Mechanismus, wie von Sola et al. (1990) vorgeschlagen, so ergibt sich folgendes Szenario:

P. mexicana – Weibchen (XX) x
P. latipinna – Männchen (ZZ):

P. latipinna – Weibchen (ZW) x
P. mexicana – Männchen (XY):

		<i>P. mex</i> ♀	
		X	
<i>P. lat</i> ♂	Z	ZX	♀

		<i>P. lat</i> ♀	
		W	Z
<i>P. mex</i>	X	WX ♀	ZX ♀
	Y	WY ♀	ZY ♂

Bei diesem Schema stellt sich heraus, daß es nur einen Genotyp geben sollte, wenn man *P. mexicana*-Weibchen (XX) mit *P. latipinna*-Männchen (ZZ) kreuzt. Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, die wir aus Kreuzungsergebnissen erhalten haben: Die F₁-Generation aus *P. mexicana* (F.O. 90) x *P. latipinna* (F.O. 90) bestand ausschließlich aus Weibchen. Daraufhin wurden Kreuzungen angesetzt, bei denen *P. latipinna* (F.O. 38) den mütterlichen Organismus darstellte, während *P. mexicana* (F.O. 38) als Vater fungierte. In diesem Fall entstanden tatsächlich Individuen beider Geschlechter, allerdings deutlich weniger Männchen (N = 6 von 30). Dies geht mit dem Schema konform.

Dies wäre ein Hinweis darauf, daß die Eingeschlechtlichkeit von *P. formosa* aufgrund der Unterschiedlichkeit der Geschlechtsdeterministen beider Eltern entstanden sein könnte.

Entstehung triploider *P. formosa*-Männchen

Kommt nun aufgrund paternaler Introgression bei den gefleckten *P. formosa*-Weibchen (XZ mit Mikrochromosomenen „m“) ein weiterer Chromosomensatz dazu (X, Y oder Z), so ergibt sich folgendes Bild:

P. formosa-Weibchen (XZ + m) x
P. mexicana-Männchen (XY):

		<i>P. form</i> ♀
		XZ + m
<i>P. mex</i> ♂	X	XXZ + m ♀
	Y	XYZ + m ♂

P. formosa-Weibchen (XZ + m) x
Liberty Molly-Männchen (vermutl. ZZ):

		<i>P. form</i> ♀
		XZ + m
Liberty Molly ♂	Z	XZZ + m ♂

Aus diesem Schema geht hervor, daß das Einschleusen eines dritten Chromosomensatzes von einem XY-Männchens in 50% der Fälle zu einem Männchen führen sollte, während die Addition eines Chromosomensatzes eines ZZ-Männchens in 100 % zu einem Männchen führen sollte. Diese Berechnung deckt sich mit unserer Beobachtung, daß unter 10 phänotypischen *P. formosa*-Männchen nur eines aus einer Paarung von gefleckten *P. formosa*-Weibchens mit *P. mexicana*-Männchen (vermutlich XY) stammt, während alle anderen Liberty Molly-Männchen als Väter haben (vermutlich ZZ). Welche Rolle in dieser Berechnung jedoch die Mikrochromosomen spielen, ist unklar. Daher wird die Klonierung der Mikrochromosomen (Kapitel 3) auch zur Aufklärung der Geschlechtsdeterminierung bei den genannten Arten beitragen können.

5.4.7 Ausblick

Um weitere Einblicke in die genetischen Mechanismen der Geschlechtsbestimmung und die Entstehung der triploiden Männchen bei *Poecilia* zu erhalten, ergeben sich folgende zukünftige Experimente:

- Es soll untersucht werden, ob die *P. formosa*-Männchen niedrigere Werte an 11-Ketotestosteron aufweisen und wie sich eventuelle Unterschiede auf die Spermatogenese und die sexuelle Motivation auswirken.
- Feulgen-Messungen an Testisgewebe (Stöck & Grosse, 1997) sollen Aufschluß darüber geben, in welchem Stadium die Spermatogenese gestört wird.
- Der Nachweis, ob die *P. formosa*-Männchen die gefleckten *P. formosa*-Weibchen bevorzugten, weil sie selbst gefleckt sind (Wahl des gleichen äußeren Erscheinungsbildes) oder weil sie mit gefleckten Tieren aufgewachsen sind (Wahl des vertrauten Stimulus), läßt sich führen, indem man Hybrid-Männchen (*P. latipinna* x *P. mexicana*) ebenfalls mit gefleckten Weibchen aufwachsen läßt und sie anschließend zwischen gefleckten und ungefleckten *P. formosa*-Weibchen wählen läßt.
- Um auszuschließen, daß die *P. formosa*-Männchen die wildtypischen, sexuellen Weibchen deshalb nicht befruchteten, weil sie diese nicht attraktiv fanden, sollten sie mit gefleckten sexuellen Weibchen verpaart werden. Diese Weibchen entstehen durch die Kreuzung sexueller Hybrid-Weibchen (*P. latipinna* x *P. mexicana*) mit Black Molly.
- Die Qualität der *P. formosa*-Spermien muß anhand künstlicher Befruchtungen sexueller Weibchen mit *P. formosa*-Spermien untersucht werden.
- Um festzustellen, welchen Einfluß die Mikrochromosomen bei der Vermännlichung im Vergleich zu dem dritten Haplom haben, sollen in einem Langzeitversuch *P. formosa* des Wildtyps (ohne Mikrochromosomen) mit Liberty Molly-Männchen angepaart werden. Im Falle der Addition eines dritten Haploms entstünden Tiere, die sich genetisch von den *P. formosa*-Männchen nur durch die Abwesenheit der Mikrochromosomen unterscheiden. Da in diesem Fall eine paternale Introgression nicht durch den Phänotyp sichtbar wird, sollte die Population stichprobenhaft mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Lamatsch et al., 2000b) auf triploide Tiere hin untersucht werden. Diese werden dann auf ihre sexuelle Entwicklung hin beobachtet und untersucht.

- Kreuzungen zwischen *P. mexicana* und Liberty Molly bzw. *P. latipinna* und Liberty Molly sollen klären, welchen Geschlechtsdeterminismus die jeweiligen Arten aufweisen.
- Um die evolutive Bedeutung von triploiden *P. formosa*-Männchen abschätzen zu können, soll im Freiland intensiv nach phänotypischen Männchen gesucht werden und diese gegebenenfalls auf ihren Ploidiegrad untersucht werden.

Die vorliegenden Ergebnisse sowie die Literatur zeigen, daß paternale Introgression selten, aber doch regelmäßig, auftritt. Allerdings scheint das Vorkommen männlicher *P. formosa* – besonders in natürlichen Habitaten – zu selten und ihre sexuelle Motivation im Vergleich zu anderen Spermiendonatoren zu gering zu sein, als daß *P. formosa*-Weibchen einen großen Vorteil davon hätten. Die *P. formosa*-Weibchen könnten nur dann von der Anwesenheit „eigener Männchen“ profitieren, wenn sie mit Spermiendonatoren vergesellschaftet sind, die stark zwischen arteigenen und artfremden Weibchen unterscheiden (z.B. *P. latipinna*). In diesem Fall hätten auch die *P. formosa*-Männchen einen indirekten Fitneßgewinn (Brown, 1980) aufgrund Verwandtschaftsselektion (Maynard-Smith, 1964; Hamilton, 1964). Demnach sollten *P. formosa*-Männchen deutlich öfter in der Population von Brownsville auftreten. Dies bestätigt die Literatur.

Einen direkten Fitneßgewinn könnten die *P. formosa*-Männchen erreichen, wenn sie – wie fertile triploide Weibchen (siehe Kapitel 4) – ihre Gene an die F_1 -Generation weitergäben. Da sie im Labor aber weder sexuelle Weibchen befruchtet noch einen im DNA-Fingerprint nachweisbaren genetischen Anteil an ihre Nachkommen mit gynogenetischen Weibchen vererbt haben, bedarf die Frage nach ihrer evolutiven Bedeutung weiterer Untersuchungen, besonders in den natürlichen Habitaten.

6 Diskussion

Der Umstand, daß Biologen ein ganz besonderes Interesse am Ungewöhnlichen bzw. Besonderen haben, läßt sich auch forschungstheoretisch rechtfertigen, denn durch die Analyse außergewöhnlicher Vorgänge erhält man oft ein besseres Verständnis für die vorherrschenden regulären Abläufe: Durch das Studium von Krebskrankheiten erhält man Wissen über die entscheidenden Vorgänge, die den normalen Ablauf von Wachstum und Entwicklung bestimmen, die Folgen von Mutationen geben Hinweise auf die Funktion normaler Gene, und ungewöhnliche Fortpflanzungsstrategien vermitteln uns die Bedeutung von Rekombination, Segregation und Fusion von Gameten.

Unisexuelle Vertebraten

In dieser Hinsicht stellen unisexuelle Vertebraten ein optimales Forschungsgebiet dar, wenn man sich die Frage nach dem Sinn von Sexualität (Bell, 1982) stellt: Bisher sind nur etwa 50 unisexuelle Arten bekannt, was etwa 0.1 % aller Vertebratenspezies darstellt. Alle unisexuellen Arten weisen alternative reproduktive Strategien zur sexuellen Fortpflanzung auf (Parthenogenese, spermienabhängige Parthenogenese, Vrijenhoek et al., 1989).

Spermienabhängige Parthenogenese

Die Ursprünge spermienabhängiger Parthenogenese (= Gynogenese) sind meist auf interspezifische Hybridisierungsereignisse (Vrijenhoek et al., 1989) oder Polyploidisierung (Beukeboom & Vrijenhoek, 1998) zurückzuführen. Die evolutive Bedeutung spermienabhängiger Parthenogenese ist unklar. Aufgrund der physiologischen Zwänge, einen Spermiodonator für die Aktivierung der Eizellen zu finden, könnte es sich dabei um ein Übergangsstadium von sexueller Reproduktion zu obligater Parthenogenese handeln (Beukeboom & Vrijenhoek, 1998). Spermienabhängige Parthenogenese könnte allerdings auch erhalten worden sein, um dem Organismus durch das eindringende Spermium die Möglichkeit zu bieten, zwischen Centrosomen zu wählen oder das paternale Genom als Vorlage für DNA-Reparaturen zu verwenden (siehe Beukeboom & Vrijenhoek, 1998). Als weiterer adaptiver Mechanismus wird paternale Introgression angeführt (Hedges et al., 1992; Scharl et al., 1995b). Die Spermienabhängigkeit zwingt unisexuelle

Parthenogenoten zweigeschlechtliche Arten zu parasitieren (Kleptospermie). Sie sind damit auf die Verbreitungsgebiete der Wirte beschränkt und können diese nicht verdrängen, ohne ihre eigene Existenz zu gefährden.

Paternale Introgression bei *P. formosa*

Bei *P. formosa* handelt es sich um ein unisexuelles Wirbeltier, das sich gynogenetisch fortpflanzt. Wie für einigen andere asexuelle Vertebraten (Hedges et al., 1992; Quattro et al., 1992; Spolsky et al., 1992) ist auch für *P. formosa* belegt (Schartl et al., 1995a), daß diese Art wesentlich älter ist, als auf der Basis von Muller's ratchet für möglich gehalten wurde (Muller, 1964; Lynch & Gabriel, 1990). Der Vorschlag von Schartl et al. (1995b), daß der evolutive Erfolg von *P. formosa* u.a. auf dem Eindringen subgenomischer DNA-Mengen in die Oozyte beruhen könnte, wodurch die Anhäufung schädlicher Mutationen durch "frisches" genetisches Material kompensiert würde, wurde von Beukeboom et al. (1995) mißverstanden und deshalb kritisiert und wird seitdem kontrovers diskutiert (Schlupp et al., 1998; Beukeboom & Vrijenhoek, 1998).

Interessanterweise konnten ausschließlich zwei Formen paternaler Introgression identifiziert werden: Mikrochromosomen und Addition des gesamten Spermienhaploms. Eigentlich wäre zu erwarten, daß jedes beliebige paternale Chromosom der enzymatischen Abbaumaschinerie, die die Oozyte normalerweise von dem Spermien genom säubert, entgehen können sollte. Dies würde in Aneuploidien mit 47 bis 68 Chromosomen resultieren. Ob Mikrochromosomen bestimmte Bereiche von Autosomen (z.B. Zentromerregion bzw. perizentrische Bereiche) darstellen, die aufgrund struktureller Besonderheiten resistent gegen Degeneration oder Abbau in der gynogenetischen Oozyte sind wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Nachdem vermutet wird, daß eine Ploidiegraderhöhung durch tatsächliche Befruchtung der diploiden Eizelle durch das Spermium einem „Verdünnungseffekt“ von Mutationen zukommt (Beukeboom & Batenburg, 2001; Beukeboom & Vrijenhoek, 1998) und auch nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann, daß es in seltenen Fällen zu Rekombination zwischen dem klonalen Genom und überzähligen Chromosomen kommt (Beukeboom & Vrijenhoek, 1998), könnte man mutmaßen, daß die spermienabhängige Parthenogenese kein rein asexueller Fortpflanzungsmodus zu sein scheint wie ursprünglich angenommen. Vor diesem

Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit die verschiedenen Formen paternaler Introgression und deren evolutive Bedeutung untersucht.

Paternale Introgression und Krebs

Parallel zum *Xiphophorus*-Melanom-System (Schartl, 1995) stellt *P. formosa* aufgrund der Klonalität ein wichtiges Modellsystem dar, um allgemeine Grundmechanismen der Tumorgenese verstehen zu können. Da das Auftreten maligner Melanome mit der Präsenz der überzähliger Chromosomen (Mikrochromosomen oder B-Chromosomen) korreliert, können die auslösenden Faktoren bereits von 1875 Mb auf etwa 4.7 Mb eingegrenzt werden.

Da überzählige Chromosomen normalerweise genetisch inert sind (Jones & Rees, 1982) liefert die Identifizierung eines Mikrochromosoms mit funktionellen paternalen Farbgenen, die in dem neuen genetischen Hintergrund exprimiert werden, einen wichtigen Aspekt im Hinblick auf die Entstehung und Evolution von B-Chromosomen. Durch die Aufklärung der Funktion solcher Gene können allgemeine Erkenntnisse über die transformierenden Vorgänge erwartet werden, die zur Ausbildung eines Tumors führen.

Die methodischen Schwierigkeiten, die sich bei der Isolierung des Mikrochromosoms aufgrund seiner geringen Größe boten, konnten mit Hilfe der AFLP-Technik überwunden werden. Die molekulare Charakterisierung der ersten mikrochromosomalen Sequenzen stellt einen ersten wichtigen Schritt zur Identifizierung der Gene dar, die für die Ausbildung maligner Melanome verantwortlich sind, sowie für einige der oben angeführten Hypothesen.

Paternale Introgression und Polyploidie

Das fast ausschließliche Vorkommen allotriploider *P. formosa* in Gebieten, in denen *P. formosa* mit der nördlichen Unterart *P. mexicana limantouri* sympatrisch vorkommt, konnte mit einer schnellen und zuverlässigen Methode zur Ploidiegradbestimmung anhand von Rückenflossenproben (Lamatsch et al., 2000b) bestätigt werden. Diese triploiden Weibchen waren fertil und produzierten ihrerseits triploide Nachkommen nachweislich bis in die dritte Generation. Dabei stellt sich die Frage, inwieweit bei diesem Befund die Interaktion zwischen der diploiden *P. formosa*-Oozyte und dem haploiden *P. mexicana limantouri*-Spermium eine Rolle spielt. Eine andere zu überprüfende Erklärungsmöglichkeit wäre, daß nur die

genetische Kombination aus *P. formosa* und *P. mexicana limantouri* in ganz seltenen Fällen fertile triploide Individuen hervorbringt. Die Chance jedoch, im Freiland einzelne Triploidisierungsereignisse in Form von sterilen Weibchen zu detektieren, ist marginal.

Da es keine hervorstechenden Einwände gegenüber einer weiteren Erhöhung des Ploidiegrades auf z.B. vier Chromosomensätze gibt, ist unklar, warum weder in natürlichen Populationen noch unter den Nachkommen triploider Freilandfänge jemals tetraploide Individuen identifiziert werden konnten. Es könnte jedoch sein, daß evtl. entstandene tetraploide *P. formosa* nicht fertil waren und somit keinen nennenswerten Beitrag zur Populationsstruktur lieferten. Diese Überlegungen lassen vermuten, daß sowohl die ursprüngliche Entstehung von diploiden sowie von triploiden *P. formosa* auf einige wenige Hybride zurückgeht bzw. jeweils auf ein einmaliges Ereignis zurückzuführen ist.

Die erstmalige Entdeckung eines Mosaiktieres bei *P. formosa* wirft weitere interessante Fragen auf, da bislang nicht geklärt ist, ob Mosaik durch verzögerte Befruchtung oder durch Genomverlust entstehen. Durch den Verlust des Minderheitensatzes (l) aus der triploiden Zygote (mlm) oder aus frühen triploiden Blastomeren könnte ein diploider, sich sexuell reproduzierender *P. mexicana* (mm) restauriert werden. In diesem Falle würde *P. formosa* keine „evolutive Sackgasse“ mehr darstellen, da die Gene in die sexuelle Population zurückfließen. Damit bekäme die Paarung der Wirtsmännchen mit den parasitischen *P. formosa*-Weibchen tatsächlich einen adaptiven Wert (Beukeboom et al., 1995).

Paternale Introgression und klonale Variabilität

In natürlichen Populationen konnte nachgewiesen werden, daß Triploide eine deutlich höhere klonale Variabilität aufweisen als Diploide, die mit paternaler Introgression in Form eines ganzen Chromosomensatzes erklärt werden könnte. Wie hoch die klonale Variabilität diploider Individuen ist, die paternale Introgression in Form von Mikrochromosomen erfahren haben, konnte bislang nicht geklärt werden. Eine Erhöhung der klonalen Variabilität durch paternale Introgression könnte evtl. einige der Nachteile von Asexualität kompensieren. Allerdings konnte noch nicht entschieden werden, ob die verschiedenen identifizierten triploiden Klone auf mehrere paternale Introgressionsereignisse zurückgehen oder auf ein einziges, wobei dann die klonale Variabilität auf individuelle Mutationsereignisse zurückzuführen wäre.

Paternale Introgression und Rekombination

Ob überhaupt und wenn ja, inwieweit jedoch Rekombination zwischen dem eingeschleusten paternalen genetischen Material und den Autosomen des asexuellen Organismus stattfindet, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Die Tatsache, daß es zyklische Parthenogenoten gibt, die sich vorwiegend asexuell fortpflanzen, aber unter bestimmten Umständen eine sexuelle Generation einschließen (Hebert, 1987), zeigt, daß „ein bißchen Rekombination so gut sein kann wie viel Rekombination“ (Green & Noakes, 1995). Bell (1988) errechnete, daß in großen Populationen Muller's ratchet schon durch eine sehr geringe Rekombinationsrate aufgehalten werden könnte. Der Nachweis von Rekombination zwischen dem eingeschleusten paternalen genetische Material und den Autosomen dürfte jedoch schwer zu führen sein.

Paternale Introgression und Umkehr der Geschlechtsdeterminierung

Die Gründe für das Auftreten der *P. formosa*-Männchen sind vermutlich auf die Kombination der Makromelanophoren-Locus-tragenden Mikrochromosomen mit einem dritten, durch ein zweites unabhängiges paternales Introgressionsereignis hinzugekommenen Chromosomensatzes zurückzuführen. Exogene Faktoren konnten weitgehend ausgeschlossen werden. Bis auf die Hypospermie und eine verringerte sexuelle Motivation konnten keine Unterschiede zu gonochoristischen Männchen festgestellt werden. Als Grund für die Produktion der wenigen, vermutlich überwiegend aneuploiden Gameten ist anzunehmen, daß die Spermatogenese triploider Männchen zu „klassischen Meiose I - Abnormitäten“ mit wahrscheinlich letalen Folgen für sexuell produzierte F₁ führt. Lediglich das außergewöhnliche Fortpflanzungsprinzip „Gynogenese“ eröffnet den triploiden *P. formosa*-Männchen die Möglichkeit, funktionell zur Entstehung von Nachkommen bei *P. formosa*-Weibchen beizutragen. Inwieweit die Abnormitäten bei der Spermatogenese, der Hormonstatus und die sexuelle Motivation der Fische zusammenhängen bedarf noch der Klärung.

Aufgrund der relativ großen Anzahl (33) an gefundenen *P. formosa*-Männchen in der Umgebung von Brownsville (Tx, USA) sowie der fast völligen Abwesenheit von triploiden *P. formosa*-Weibchen in dieser Gegend drängt sich die Überlegung auf, ob sich dort nicht alle Triploiden *P. formosa* zu Männchen entwickelten. Da bis vor kurzem der Ploidiegrad der identifizierten Männchen nicht berücksichtigt wurde,

wären diese Individuen nicht als Triploide in die Statistik eingegangen. Dem soll nachgegangen werden.

Die evolutive Rolle triploider Männchen im *P. formosa*-Fortpflanzungskomplex kann nicht abschließend beurteilt werden. Angesichts der geringen Häufigkeit ihres Auftretens scheinen sie auf Populationsebene ein eher unbedeutendes Phänomen darzustellen. Für die Evolutionsbiologie legt ihre Entstehung jedoch wichtige Mechanismen bezüglich der Funktionalität scheinbar entbehrlicher Gene sowie der Geschlechtsbestimmung bei der Gattung *Poecilia* offen.

Die vorliegenden Ergebnisse über paternale Introgression (Abbildung 56) können zur Aufklärung der Frage beitragen, warum *P. formosa* und andere asexuelle Organismen offenbar länger überlebten als vorhergesagt. Im Gegensatz zu den bisherigen Annahmen könnte es sich bei spermienabhängiger Parthenogenese nicht etwa nur um eine unvollkommene Parthenogenese handeln, sondern um einen gut angepaßten Fortpflanzungsmodus, der die Vorteile von asexueller mit denen sexueller Fortpflanzung kombiniert.

7 Zusammenfassung

Die Frage nach der Entstehung und Beibehaltung von sexueller Reproduktion nimmt in der Biologie eine zentrale Stellung ein. Dazu werden seit langem die Vor- und Nachteile asexueller Fortpflanzung diskutiert, da man sich von einer vergleichenden Betrachtungsweise wichtige Aufschlüsse erwartet. Dem kurzfristigen Vorteil der schnelleren Vermehrung stehen langfristige Nachteile entgegen: Aufgrund fehlender genetischer Rekombinationsprozesse können sich schädliche Mutationen im Laufe der Generationen anhäufen („Muller’s ratchet“), und schnelle Anpassung an eine veränderte Umwelt oder neue Abwehrstrategien gegen Parasiten werden erschwert.

Der Amazonenkärpfling, *Poecilia formosa*, stellt einen Organismus dar, dessen Fortpflanzung in Folge eines interspezifischen Hybridisierungsereignisses vom üblichen bisexuellen Muster abweicht: Es treten normalerweise nur Weibchen auf, die sich gynogenetisch vermehren. Hierbei werden die unreduzierten diploiden Eizellen durch Spermien sympatrisch vorkommender sexueller Wirtsmännchen nahe verwandter Arten (*P. latipinna* oder *P. mexicana*) stimuliert, um eine parthenogenetische Entwicklung der Embryonen zu initiieren. Es findet keine Karyogamie statt, so daß die Nachkommen in der Regel untereinander und mit ihren Müttern genetisch identisch (klonal) sind.

Molekularbiologische Untersuchungen ergaben jedoch, daß *P. formosa* wesentlich älter ist, als dies auf der Basis von „Muller’s ratchet“ zu erwarten war. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß in seltenen Fällen väterliches Erbmaterial an die Nachkommen weitergegeben werden kann (paternale Introgression). Sowohl in natürlichen Lebensräumen als auch unter Laborbedingungen konnten nur zwei Formen paternaler Introgression identifiziert werden: Kommt es aufgrund von Karyogamie zu einer tatsächlichen Befruchtung der diploiden Oozyte durch das haploide Spermium entstehen triploide Individuen. In anderen Fällen verbleiben nach der Aktivierung durch das artfremde Spermium nur geringe DNA-Mengen in der Oozyte, die in den Kern aufgenommen werden und im Karyotyp als überzählige Chromosomen, sog. Mikrochromosomen, zu identifizieren sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß paternale Introgression ein fester Bestandteil natürlicher Populationen von *P. formosa* ist. Mittels einer eigens dazu etablierten minimal-invasiven Methode zur durchflußzytometrischen Messung des DNA-Gehalts an Rückenflossenmaterial wurde die Häufigkeit triploider Individuen im Río Purificación (Mexiko) bestimmt. Triploide Freilandfänge sind fertil

und produzieren mindestens bis in die dritte Generation ausschließlich triploide Nachkommen ohne eine weitere Anhebung des Ploidiegrades. Die Vermutung, triploide *P. formosa* könnten eine erhöhte Wachstumsrate aufweisen, konnte nicht bestätigt werden. Die erhaltenen Hinweise auf eine erhöhte Reproduktionsrate Triploider widersprechen den Literaturdaten und bedürfen weiterer Untersuchungen. Mit Multilocus DNA-Fingerprints wurde festgestellt, daß Triploide eine höhere klonale Variabilität aufweisen als Diploide. Dieses Ergebnis könnte auf die paternale Introgression zurückzuführen sein. Anhand von Karyotypisierungen konnten fünf verschiedene chromosomale Klone identifiziert und deren Häufigkeit ermittelt werden. Die Identifizierung des ersten diploid/triploiden Mosaiktieres bei *P. formosa* eröffnet neue Perspektiven in Hinblick auf den adaptiven Wert spermienabhängiger Parthenogenese, da evtl. die eingeschleusten paternalen Gene der Wirtsmännchen wieder in die sexuelle Population zurückfließen könnten. In Habitaten außerhalb des Río Purificación konnte keine paternale Introgression festgestellt werden.

Die Untersuchung paternaler Introgression bei *P. formosa* schließt neben Triploidie auch das Auftreten von Mikrochromosomen mit ein. Unter Laborbedingungen waren Individuen aufgetreten, die Mikrochromosomen von Black Molly, einer schwarzen Zuchtform der Gattung *Poecilia*, erhalten haben. Da einige der Mikrochromosomenträger ebenfalls ein Pigmentmuster ausbildeten, sind die Mikrochromosomen offensichtlich Träger der dominanten Gene, die bei Black Molly für die Schwarzfärbung codieren. Ein Teil der Individuen entwickelt, ausgehend von diesen Pigmentflecken, maligne Melanome. Durch die Aufklärung der Funktion solcher Gene können allgemeine Erkenntnisse über die transformierenden Vorgänge erwartet werden, die zur Ausbildung eines Tumors führen. Mikrochromosomen-tragende *P. formosa* haben damit das Potential, als neues Modellsystem für die Krebsforschung zu dienen.

Mit Hilfe der AFLP-Fingerprint-Technik konnten erste mikrochromosomale Sequenzen identifiziert werden und z.T. näher charakterisiert werden. Zu der bislang erhaltenen Sequenz gibt es zum jetzigen Zeitpunkt in keiner der verfügbaren Datenbanken Homologien. Die relativ schwache Intensität der Bande läßt jedoch vermuten, daß es sich dabei nicht um eine hochrepetitive Sequenz handelt, womit die Chance besteht, daß es sich bei der isolierten Sequenz um einen Teilbereich eines Gens handeln könnte. Da überzählige Chromosomen normalerweise genetisch inert sind, liefert die Identifizierung von Mikrochromosomen mit funktionellen paternalen Farbgenen, die in dem neuen genetischen Hintergrund

exprimiert werden, einen wichtigen Aspekt in Hinblick auf die Entstehung und Evolution von überzähligen Chromosomen.

Die beiden Formen paternaler Introgression können jedoch auch kombiniert vorliegen. So handelte es sich bei den unter Laborbedingungen spontan aufgetretenen *P. formosa*-Männchen ausnahmslos um Tiere, die zu den paternal eingeschleusten Mikrochromosomen von Black Molly durch ein zweites Introgressionereignis ein weiteres Genom von einem wildtypisch gefärbten Männchen erhalten hatten. Die Allotriploidie konnte im Multilocus DNA-Fingerprint nachgewiesen werden. Der Vergleich zu Männchen gonochoristischer Arten (*P. mexicana*, *P. latipinna* sowie deren Hybride) ergab keine Unterschiede im Sexualverhalten und in der Morphologie sekundärer Geschlechtsmerkmale. Es wurden jedoch Unterschiede in der sexuellen Motivation, in den Differenzierungsstadien der Gameten in den Testes, sowie der Anzahl und dem Ploidiegrad der Spermien festgestellt. Diese Unterschiede ergaben sich wahrscheinlich alle aus dem somatischen Ploidiegrad: Synapsis führte in der Spermatogenese der triploiden Männchen zu Bi- und Univalenten, die ungleichmäßig auf die Gameten verteilt wurden. Daraus resultierten nur wenige, vermutlich überwiegend aneuploide Spermien. Diese reichen qualitativ aus, um die Embryogenese bei gynogenetischen Weibchen zu initiieren, jedoch nicht, um die Gameten sexueller Weibchen zu befruchten. Inwieweit die Abnormitäten bei der Spermatogenese den Hormonstatus und die sexuelle Motivation der Fische beeinflussen, soll in nächster Zukunft untersucht werden. Die evolutive Bedeutung der triploiden Männchen liegt wohl vor allem in dem gewonnenen Einblick in die Funktionalität scheinbar entbehrllicher Gene in unisexuellen Arten und die Geschlechtsbestimmung bei der Gattung *Poecilia*.

Die vorliegenden Ergebnisse über paternale Introgression können zur Aufklärung der Frage beitragen, warum *P. formosa* und andere asexuelle Organismen offenbar länger überlebten, als vorhergesagt. Im Gegensatz zu den bisherigen Annahmen könnte es sich bei spermienabhängiger Parthenogenese nicht etwa nur um eine unvollkommene Parthenogenese handeln, sondern um einen gut angepassten Fortpflanzungsmodus, der die Vorteile von asexueller mit denen sexueller Fortpflanzung kombiniert.

8 Summary

One of the greatest challenges in evolutionary biology is explaining the widespread occurrence of sexual reproduction and the associated process of genetic recombination. Comparing the advantages and disadvantages of sexual and asexual reproduction is expected to give major insights to that „queen of questions“. Whereas asexual females have the short term advantage of producing twice as many daughters as sexual females, they are also expected to suffer from long-term constraints: Due to the absence of genetic recombination, asexuals are prone to accumulate deleterious mutations (Muller's ratchet), and adaptation to changing environments or the escape from parasite load will be aggravated.

The Amazon molly, *P. formosa*, resembles an organism which shows an alternative reproductive mode to the ubiquitous bisexual reproduction. Being an all-female species due to interspecific hybridization, it reproduces gynogenetically: Unreduced diploid eggs are only activated by sperm of males of closely related sympatric species. Without karyogamy the oocytes develop parthenogenetically leading to genetically identical (clonal) offspring.

Molecular phylogenetic data suggest that *P. formosa* might have survived longer than predicted by Muller's ratchet. To explain this paradox, two phenomena which have been observed in natural populations as well as in laboratory broods are taken into consideration: Triploidy and occurrence of microchromosomes as a consequence of paternal introgression. Both forms of paternal introgression allow the transfer of fresh genetic material that could compensate for Muller's ratchet.

Triploidy results from the successful insemination of the unreduced diploid eggs with haploid host sperm and subsequent karyogamy, whereas microchromosomes are small supernumerary chromosomes that seem to be the left over of the enzymatic machinery which normally clears the egg from the sperm nucleus after activation has occurred.

In the work presented here it has been shown that paternal introgression is a stable component of natural populations of *P. formosa*. Using cell samples from the dorsal fin of living fishes for flow cytometric determination of the nuclear DNA content, the frequency of triploids from the Río Purificación (Mexico) was analyzed. Wild-caught triploid females are fertile and produce exclusively triploid offspring gynogenetically which was proved for up to three generations. No further elevation of the ploidy level

was ever detected. Presumed faster growth rates of triploids could not be confirmed whereas the here observed higher reproductive success of triploids is contradictory to reports in the literature. These problems require further studies. By using multilocus fingerprinting a higher clonal variability of triploids *versus* diploids could be detected that might be the consequence of paternal introgression. Karyotypic analysis revealed five different chromosomal clones and their frequency in the Río Purificación. The detection of the first $2n/3n$ mosaic opens new perspectives of gynogenesis being adaptive, namely if the paternal genes may flow back into the sexual population. From locations others than in the Río Purificación, no fish with this type of paternal introgression were found.

Besides triploidy we also investigated the occurrence of microchromosomes as a consequence of paternal introgression. These microchromosomes are of special interest as they obviously carry the dominant genes coding for the black body pigmentation of the Black molly. Some animals develop malignant melanomas originating from these black blotches. Therefore, identifying the function of these genes is expected to provide important insights into the transforming processes leading to tumor formation. Black spotted fish carrying two to three microchromosomes from the Black molly were used to isolate microchromosome-specific sequences. By using AFLP based fingerprinting technique the first microchromosome-specific sequence could be identified. Yet, it renders no homologies in any of the available data bases. However, the weak signal of the selected band indicates that it is not a highly repetitive sequence. Hence, there is a fairly good chance that this sequence represents a fragment of a gene. Normally being genetically inert, the identification of supernumerary chromosomes with functional paternal genes that are expressed in a foreign genetic background will help to elucidate how supernumerary chromosomes originate and evolve.

Both forms of paternal introgression may also occur in combination. It was shown that the animals from the microchromosome-carrying stock of *P. formosa* which spontaneously developed into males were all carrying an additional haplome most probably from a wild-type pigmented *Poecilia* male. Multilocus fingerprinting proved their allotriploid state. Comparing these triploid *P. formosa* males qualitatively with gonochoristic males (*P. mexicana*, *P. latipinna*, Hybrids) no significant differences could be resolved in the mate choice behavior or male secondary sexual characteristics. However, differences were detected in the sexual motivation,

differentiation of gametes in the testes, as well as in number and DNA content of sperm. These recorded differences might probably all be traced back to their somatic ploidy level: During synapsis in meiosis I bivalents as well as univalents are formed which lead after segregation to predominantly unbalanced gametes. These manage to stimulate embryogenesis in gynogenetic females but fail to fertilize sexual ova. To which extent the abnormal spermatogenesis, the hormone levels, and the sexual motivation are effected by each other has to be investigated in the future.

The evolutionary significance of triploid males is mainly based on the information we are gaining about the function of dispensable genes and sex determining mechanisms in *Poecilia*.

The results on paternal introgression obtained here can contribute to answer the question why *P. formosa* as well as other unisexual vertebrates survived longer than predicted. Contradictory to common knowledge, gynogenesis might not be an imperfect parthenogenesis but a well adapted reproductive mode combining the advantages of asexual and sexual reproduction.

9 Abkürzungen

$[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$	α -markiertes 2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
Ci	Curie
dATP/CTP/GTP/TTP	2'-Desoxy-Adenosin/Cytidin/Guanosin/Thymidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
$[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$	γ -markiertes Adenosin-5'-Triphosphat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
J	Joule
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
μ	Micro- ($\times 10^{-6}$)
m	Milli- ($\times 10^{-3}$)
M	molar, mol/l
min	Minute(n)
n	Nano ($\times 10^{-9}$)
NaAc	Natriumacetat
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm

p	Piko-, ($\times 10^{-12}$)
p.a.	„pro analysi“
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PNK	Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
T_m	Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units, Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
W	Watt
(w/v)	Masse pro Volumen

10 Literatur

- Adam D, Dimitrijevic N, Schartl M (1993) Tumor suppression in *Xiphophorus* by an accidentally acquired promoter. *Science* **259**: 816-819
- Adkins-Regan E, Mansukhani V, Thompson R, Yang S (1997) Organizational actions of sex hormones on sexual partner preference. *Brain Res Bull* **44**: 497-502
- Ahuja MR, Anders F (1976) A genetic concept of the origin of cancer, based in part upon studies of neoplasms in fishes. *Prog. Exp. Tumor Res* **20**: 380-397
- Altmann J (1974) Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour* **49**: 227-267
- Anders F, Schartl M, Barnekow A, Anders A (1984) *Xiphophorus* as an in vivo model for studies on normal and defective control of oncogenes. *Adv. Cancer Res* **42**: 191-275
- Avise JC, Quattro JM, Vrijenhoek RC (1992) Molecular clones within organismal clones. *Evolutionary Biology* [26], 225-245. Plenum Press, New York.
- Baker BS, Carpenter AT, Esposito MS, Esposito RE, Sandler L (1976) The genetic control of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* **10**: 53-134
- Balsano JS, Darnell RM, Abramoff P (1972) Electrophoretic evidence of triploidy associated with populations of the gynogenetic teleost *Poecilia formosa*. *Copeia* **2**: 292-297
- Balsano JS, Kucharski K, Randle EJ, Rasch EM, Monaco PJ (1981) Reduction of competition between bisexual and unisexual females of *Poecilia* in northeastern Mexico. *Env. Biol. Fish.* **6**: 39-48
- Balsano JS, Randle EJ, Rasch EM, Monaco PJ (1985) Reproductive behavior and the maintenance of all-female *Poecilia*. *Env. Biol. Fish.* **12**: 251-263
- Balsano JS, Rasch EM, Monaco PJ (1983) Reproductive interactions within bisexual/unisexual complexes of *Poecilia* from the Río Purificación in northeastern Mexico. *Nat. Geogr. Soc. Res. Repts.* **1976** Projekts: 113-135
- Balsano JS, Rasch EM, Monaco PJ (1989) The evolutionary ecology of *Poecilia formosa* and its triploid associate. In *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*, Meffe GK, Snelson FFJ (eds) pp 277-297. Prentice Hall: Englewood Cliffs, New Jersey
- Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A (1999) Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and molecular life sciences* **55**: 910-931
- Battaglia E (1964) Cytogenetics of B chromosomes. *Caryologia* **17**: 245-299
- Bell G (1982) The masterpiece of nature: the evolution of sex and the genetics of sexuality. University of California Press, Berkeley

- Bell G (1988) Sex and death in Protozoa: the history of an obsession. Cambridge University Press, Cambridge
- Benazzi Lentati G (1979) Polyploidy and types of development in the triclad *Dugesia lugubris* S.L.: Interaction between the ploidy level and the origin of amphimixis or pseudogamy. *Caryologia* **32**: 247-263
- Benazzi M (1982) Speciation events evidenced in Turbellaria. *Prog. Clin. Biol. Res* **96**: 307-344
- Beukeboom LW, Batenburg FHD (in prep.) Paternal leakage accelerates Muller's ratchet but retards its effects.
- Beukeboom LW, Vrijenhoek RC (1998) Evolutionary genetics and ecology of sperm-dependent parthenogenesis. *Journal of Evolutionary Biology* **11**: 755-782
- Beukeboom LW, Weinzierl RP, Michiels NK (1995) Amazon molly and Muller's ratchet. *Nature* **375**: 111-112
- Bickham JW, Hanks BG, Hale DW, Martin JE (1993) Ploidy diversity and the production of balanced gametes in male twist-necked turtles (*Platemys platycephala*). *Copeia* **1993**: 723-727
- Bickham JW, Tucker PK, Legler JM (1985) Diploid-triploid mosaicism: an unusual phenomenon in side-necked turtles (*Platemys platycephala*). *Science* **227**: 1591-1593
- Billard R (1984) Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. *Cell Tissue Res* **237**: 219-226
- Billard R (1986) Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dev.* **26**: 877-920
- Blin N, Stafford DW (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **3**: 2303-2308
- Bogart JP (1980) Evolutionary significance of polyploidy in amphibians and reptiles. In *Polyploidy: biological relevance*, Lewis WH (ed) pp 341-378. Plenum Press, New York
- Borg B (1987) Stimulation of reproductive behaviour by aromatizable and non-aromatizable androgens in male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. In *Proc V Congr. Europ. Ichtyol.*, Kullander SOK, Fernholm B (eds) pp 269-271. Stockholm
- Brantley RK, Wingfield JC, Bass AH (1993) Sex steroid levels in *Porichthys notatus*, a fish with alternative reproductive tactics, and a review of the hormonal bases for male dimorphism among teleost fishes. *Horm. Behav.* **27**: 332-347
- Brown JL (1980) Fitness in complex avian social systems. In *Evolution of social behaviour*, Markl H (ed) pp 115-128. Verlag Chemie, Weinheim
- Bulger AJ, Schultz RJ (1982) Origins of thermal adaptation in northern vs southern populations of a unisexual hybrid fish. *Evolution* **36**: 1041-1050

- Camacho JP, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **355**: 163-178
- Carter RE, Mair GC, Skibinski DOF, Parkin DT, Beardmore JA (1991) The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia. *Aquaculture* **95**: 41-52
- Castelli M (1994) Study on sex determination in the common barbel (*Barbus barbus* L.) (Pisces, Cyprinidae) rising gynogenesis. In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, Beaumont AR (ed) pp 509-519. Chapman and Hall, London
- Chambers J (1987) The cyprinodontiform gonopodium, with an atlas of the fishes of the genus *Limia*. *Journal of Fish Biology* **30**: 389-418
- Christensen B (1960) A comparative cytological investigation of the reproductive cycle of an amphimictic diploid and a parthenogenetic triploid form of *Lumbricillus lineatus* (O.F.M.) (Oligochaeta, Enchytraeidae). *Chromosoma* **11**: 365-379
- Cimino MC (1972) Meiosis in triploid all-female fish (*Poeciliopsis*, *Poeciliidae*). *Science* **175**: 1484-1486
- Comings DE, Okada TA (1971) Triple chromosome pairing in triploid chickens. *Nature* **231**: 119-121
- Conover DO, Heins SW (1987) Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish. *Nature* **326**: 496-498
- Constantz GD (1989) Reproductive biology of Poeciliid fishes. In *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*, Meffe GK, Snelson FFJ (eds) pp 33-68. Prentice Hall, New Jersey
- Cram LS, Campbell M, Fawcett JJ, Deaven LL (1990) Polyamine buffer for bivariate human flow cytogenetic analysis and sorting. In *Methods in cell biology*, pp 377.
- Cuellar O (1971) Reproduction and the mechanism of meiotic restitution in the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus uniparens*. *J. Morphol.* **133**: 139-165
- Czolowska R, Modlinski JA, Tarkowski AK (1984) Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes. *J. Cell Sci* **69**: 19-34
- Darevski IS, Kupriyanova LA, Danielyan FD (1986) New evidence of hybrid males in a parthenogenetic lizard. In *Studies in herpetology*, Rocek R (ed) pp 277-212. Prague, Cz
- Darnell RM, Abramoff P (1968) Distribution of the gynogenetic fish, *Poecilia formosa*, with remarks on the evolution of the species. *Copeia* **1968**: 354-361
- Dawley RM (1989) An introduction to unisexual vertebrates. In *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*, Dawley RM, Bogart JP (eds) pp 1-18. New York State Museum, Albany, New York

- Dawley RM, Goddard KA (1988) Diploid-triploid mosaics among unisexual hybrids of the minnows *Phoxinus eos* and *Phoxinus neogaeus*. *International Journal of Organic Evolution* **42**: 649-659
- DeFelice DA, Rasch EM (1969) Chronology of spermatogenesis and spermiogenesis in Poeciliid fishes. *Journal of Experimental Zoology* **171**: 191-207
- Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C (1988) A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res.* **16**: 9878
- deWet JM (1979) Origins of polyploids. *Basic Life Sci* **13**: 3-15
- Doncaster CP, Pound GE, Cox SJ (2000) The ecological cost of sex. *Nature* **404**: 281-285
- Döbler M (1998) Zum Fortpflanzungsmodus des Amazonenkärpflings (*Poecilia formosa* (Girard 1859)). 46-114. Dissertation, Universität Hamburg.
- Döbler M, Schlupp I, Parzefall J (1997) Changes in mate choice in spontaneous masculinisation in *Poecilia formosa*. *Ethology* **32**, 104.
- Dramsch W (1977) Gynogenese bei *P. formosa*. Das Verhalten künstlich erzeugter Männchen und die Konsequenzen für die systematische Stellung dieser Art. Dissertation, Universität Hamburg.
- Dries LA (1998) Coevolutionary hypothesis and evolution of mate discrimination in a gynogenetic species complex of Amazon mollies. Tagungsband des 78. jährlichen Treffens des ASIM
- Dugatkin LA, Godin JG (1992) Reversal of female mate choice by copying in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci* **249**: 179-184
- Ellegren H (2000) Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 188-192
- Evans EP, Breckon G, Ford CE (1964) An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* **3**: 289-294
- Fawcett DW (1956) The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**: 403-406
- Fechheimer NS, Isakova GK, Belyaev DK (1983) Mechanisms involved in the spontaneous occurrence of diploid-triploid chimerism in the mink (*Mustela vison*) and chicken (*Gallus domesticus*). *Cytogenet. Cell Genet.* **35**: 238-243
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13
- Foran CM, Ryan MJ (1994) Female-female competition in a unisexual/bisexual complex of mollies. *Copeia* **1994**: 504-508
- Franck D (1975) Der Anteil des "Coolige-Effektes" ann der isolationsbedingten Zunahme sexueller Verhaltensweisen von *Poecilia shenops*. *Z. Tierpsychol.* **38**: 472-481

- Gallardo MH, Bickham JW, Honeycutt RL, Ojeda RA, Kohler N (1999) Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* **401**: 341
- Gerall AA, Givon L (1992) Early androgens and age-related modifications in female rat reproduction. In *Sexual differentiation. Handbook of behavioral neurobiology*, Gerall AA, Moltz H, Ward I (eds) pp 313-354. 11. Plenum Press, New York
- Goddard KA, Schultz RJ (1993) Aclonal reproduction by polyploid members of the clonal hybrid species *Phoxinus eos-neogaeus* (Cyprinidae). *Copeia* **3**: 650-660
- Gordon M (1927) The genetics of a viviparous topminnow *Platycoecilius*: the inheritance of two kinds of melanophores. *Genetics* **12**: 253-283
- Graf JD, Polls Pelaz M (1989) Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex. In *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*, Dawley RM, Bogart JP (eds) pp 289-302. New York State Museum, Albany, New York
- Green RF, Noakes DLG (1995) Is a little bit of sex as good as a lot? *Journal of theoretical biology* **174**: 87-96
- Gutbrod H, Scharl M (1999) Intragenic sex-chromosomal crossovers of Xmrk oncogene alleles affect pigment pattern formation and the severity of melanoma in *Xiphophorus*. *Genetics* **151**: 773-783
- Haldane JBS (1922) Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics* **122**: 101-109
- Hamaguchi S, Egami N (1980) The male secondary sex characteristics in the gynogenetic female fish, *Poecilia formosa*, induced by the administration of methyltestosterone. *Annotationes Zoologicae Japonenses* **53**: 227-230
- Hamilton WD (1964) The genetical evolution of social behaviour. *Journal of theoretical biology* **7**: 1-52
- Hanahan D (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA cloning*, Glover DM (ed) pp 109-135. IRL press, Oxford
- Haskins CP, Haskins EF, Hewitt RE (1960) Pseudogamy as an evolutionary factor in the poeciliid fish *Mollienisia formosa*. *Evolution* **14**: 473-483
- Häussler G (1928) Über Melanombildung bei Bastarden von *Xiphophorus maculatus* var. *rubra*. *Klin. Wochenschr.* 1561-1562
- Hebert PDN (1987) Genotypic characteristics of cyclic parthenogens and their obligately asexual derivatives. In *The evolution of sex and its consequences*, Stearns SC (ed) Birkhauser Verlag, Basel
- Hedges SB, Bogart JP, Maxson LR (1992) Ancestry of unisexual salamanders. *Nature* **356**: 708-710
- Hill DP, Shakes DC, Ward S, Strome S (1989) A sperm-supplied product essential for initiation of normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* is encoded by the paternal-effect embryonic-lethal gene, spe-11. *Dev. Biol.* **136**: 154-166

- Hubbs C (1964) Interactions between a bisexual fish species and its gynogenetic sexual parasite. *Bulletin of the Texas Memorial Museum* **8**: 1-72
- Hubbs C, Drewry GE, Warburton B (1959) Occurrence and morphology of a phenotypic male of a gynogenetic fish. *Science* **129**: 1227-1229
- Hubbs CL (1955) Natural hybridization in fishes. *Syst. Zool* **4**: 1-20
- Hubbs CL, Hubbs LC (1932) Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin. *Science* **76**: 628-630
- Hubbs CL, Hubbs LC (1946a) Breeding experiments with the invariably female, strictly matroclinous fish, *Mollienesia formosa*. *Genetics* **31**: 218
- Hubbs CL, Hubbs LC (1946b) Experimental breeding of the Amazon molly. *Aquarium Journal (San Francisco)* **17**: 4-6
- Jones RN, Rees H (1982) *B chromosomes*. Academic Press, New York
- Judson OP, Normark BN (1996) Ancient asexual scandals. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 41-46
- Kadow PC (1954) An analysis of sexual behavior and reproductive physiology in the guppy, *Poecilia reticulata* (Peters). Dissertation, New York University, New York
- Kallman KD (1962a) Gynogenesis in the teleost, *M. formosa*, with discussion of the detection of parthenogenesis in vertebrates by tissue transplantation. *Journal of Genetics* **58**: 7-21
- Kallman KD (1962b) Population genetics of the gynogenetic teleost *Mollienesia formosa* (Girard). *Evolution* **16**: 497-504
- Kallman KD (1964) Homozygosity in a gynogenetic fish, *Poecilia formosa*. *Genetics* **50**: 260-262
- Kallman KD (1975) The platyfish, *Xiphophorus maculatus*. In *Handbook of Genetics*, King RC (ed) pp 81-132. Plenum Publishing Corp., New York
- Kimmel CB, Warga RM (1986) Tissue-specific lineages originate in gastrula of the zebrafish. *Science* **231**: 365-368
- Kobayashi H (1971) A cytological study on gynogenesis of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*). *Zool. Mag.* **80**: 316-322
- Kobayashi M, Nakanishi T (1999) 11-ketotestosterone induces male-type sexual behavior and gonadotropin secretion in gynogenetic crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Gen. Comp Endocrinol.* **115**: 178-187
- Komar A (1982) Fertilization of parthenogenetically activate mouse eggs. I. Behaviour of sperm nuclei in the cytoplasm of parthenogenetically activated eggs. *Exp. Cell Res* **139**: 361-367

- Komen J, Eding EH, Bongers ABJ, Richter CJJ (1993) Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio*). 4. Growth, phenotypic variation and gonad differentiation in normal and methyltestosterone-treated homozygous clones and F₁ hybrids. *Aquaculture* **111**: 271-280
- Komen J, Richter CJJ (1990) Sex control in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Rec. Adv. Aquacult.* **4**: 78-86
- Kondrashov AS (1993) Classification of hypotheses on the advantage of amphimixis. *J. Hered.* **84**: 372-387
- Kosswig C (1928) Über Kreuzungen zwischen den Teleostiern *Xiphophorus helleri* und *Platypoecilus maculatus*. *Z. Indukt. Abstammungs-Vererbungslehre* **47**: 150-158
- Krawetz SA, Kramer JA, McCarrey JR (1999) Reprogramming the male gamete genome: a window to successful gene therapy. *Gene* **234**: 1-9
- Kuntz A (1913) Notes on the habits, morphology of the reproductive organs, and embryology of the viviparous fish *Gambusia affinis*. *Bull US Bur. Fisheries* **33**: 177-190
- Kupriyanova LA (1989) Cytogenetic evidence for genome interaction in hybrid lacertid lizards. In *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*, Dawley RM, Bogart JP (eds) pp 236-240. New York State Museum, Albany, NY
- Lai E, Birren BW, Clark SM, Simon MI, Hood L (1989) Pulsed field gel electrophoresis. *Biotechniques* **7**: 34-42
- Lamatsch DK, Nanda I, Epplen JT, Schmid M, Scharl M (2000a) Unusual Triploid males in a microchromosome-carrying clone of the amazon molly, *Poecilia formosa*. *Cytogenet. Cell Genet.* **91**: 148-156
- Lamatsch DK, Steinlein C, Schmid M, Scharl M (2000b) Noninvasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: detection of triploid *Poecilia formosa*. *Cytometry* **39**: 91-95
- Landeau L, Terborgh J (1986) Oddity and the "confusion effect" in predation. *Animal Behaviour* **34**: 1372-1380
- Lanier GN, Kirkendall LR (1986) Karyology of pseudogamous *Ips* bark beetles. *Hereditas* **105**: 87-96
- Lima NRW, Koback CJ, Vrijenhoek RC (1996) Evolution of sexual mimicry in sperm-dependent clonal forms of *Poeciliopsis* (Pisces: *Poeciliidae*). *Journal of Evolutionary Biology* **9**: 185-203
- Lynch M, Burger R, Butcher D, Gabriel W (1993) The mutational meltdown in asexual populations. *J. Hered.* **84**: 339-344
- Lynch M, Gabriel W (1990) Mutation load and the survival of small populations. *Evolution* **44**: 1725-1737
- Magurran AE, Seghers B.H., Shaw PW, Carvalho GR (1994) Schooling preferences for familiar fish in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Journal of Fish Biology* **45**: 401-406

- Mair GC, Scott AG, Penman DJ, Skibinski DOF, Beardmore JA (1991) Sex determination in the genus *Oreochromis*: I. Sex reversal, hybridization, gynogenesis and triploidy in *O. aureus* Steindachner. *Theor. appl. Genet.* **82**: 153-160
- Maynard-Smith J (1964) Group selection and kin selection. *Nature* **201**: 1145-1147
- Maynard-Smith J (1978) The evolution of sex. Cambridge University Press, Cambridge
- McRobert SP, Bradner J (1998) The influence of body coloration on shoaling preferences in fish. *Animal Behaviour* **56**: 611-615
- McVean GT (1995) Fractious chromosomes: hybrid disruption and the origin of selfish genetic elements. *BioEssays* **17**: 579-582
- Menzel BW, Darnell RM (1973) Morphology of naturally occurring triploid fish related to *Poecilia formosa*. *Copeia* **2**: 350-352
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y (1991) Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**: 5774-5778
- Monaco PJ, Rasch EM, Balsano JS (1978) Cytological evidence for temporal differences during the asynchronous ovarian maturation of bisexual and unisexual fishes of the genus *Poecilia*. *Journal of Evolutionary Biology* **13**: 33-44
- Monaco PJ, Rasch EM, Balsano JS (1981) Sperm availability in naturally occurring bisexual-unisexual breeding complexes involving *Poecilia mexicana* and the gynogenetic teleost, *Poecilia formosa*. *Env. Biol. Fish.* **6**: 159-166
- Monaco PJ, Rasch EM, Balsano JS (1984) Apomictic reproduction in the Amazon molly, *Poecilia formosa*, and its triploid hybrids. In *Evolutionary genetics of fishes*, Turner BJ (ed) pp 311-328. Plenum Press, New York
- Monaco PJ, Rasch EM, Balsano JS, Turner BJ (1982) Muscle protein phenotypes and the probable evolutionary origin of a unisexual fish, *Poecilia formosa* (Pisces: *Poeciliidae*), and its triploid derivatives. *Journal of Experimental Zoology* **221**: 265-274
- Moomjy M, Colombero LT, Veeck LL, Rosenwaks Z, Palermo GD (1999) Sperm integrity is critical for normal mitotic division and early embryonic development. *Mol Hum. Reprod.* **5**: 836-844
- Morescalchi A (1992) Chromosomes, sex determination and environment in teleosts. In *Sex Origin and Evolution*, Dailai R (ed) pp 137-149. Mucchi, Modena
- Moses MJ (1956) Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**: 215-218
- Muller HJ (1925) Why polyloidy is rarer in animals than in plants. *American Naturalist* **59**: 346-353

- Muller HJ (1964) The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res* **1**: 2-9
- Murayama Y, Hijikata M, Kojima M, Noda M, Kajishima T (1986) The appearance of diploid-triploid and diploid-triploid-tetraploid mosaic individuals in polyploid fish, ginbuna (*Carassius auratus langsdorffii*). *Experientia* **42**: 187-188
- Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schröder JH, Zischler H, Epplen JT (1990) Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *Journal of Molecular Evolution* **30**: 456-462
- Nanda I, Scharl M, Feichtinger W, Schlupp I, Parzefall J, Schmid M (1995) Chromosomal evidence for laboratory synthesis of a triploid hybrid between the gynogenetic teleost *Poecilia formosa* and its host species. *Journal of Fish Biology* **47**: 619-623
- Ohno S (1974) *Animal cytogenetics*. Gebrüder Borntraeger, Berlin
- Orr HA (1990) "Why polyploidy is rarer in animals than in plants" revisited. *American Naturalist* **136**: 759-770
- Pandian TJ, Koteeswaran R (1998) Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* **384**: 167-243
- Parzefall J (1969) Zur vergleichenden Ethologie verschiedener *Mollienesia*-Arten einschließlich einer Höhlenform von *M. sphenops*. *Behaviour* **33**: 1-38
- Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N (1999) Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell Mol Life Sci* **55**: 887-900
- Prehn LM, Rasch EM (1969) Cytogenetic studies of *Poecilia* (Pisces). I. Chromosome numbers of naturally occurring poeciliid species and their hybrids from Eastern Mexico. *Can. J. Genet. Cytol.* **11**: 880-895
- Quattro JM, Avise JC, Vrijenhoek RC (1992) An ancient clonal lineage in the fish genus *Poeciliopsis* (Atheriniformes: *Poeciliidae*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 348-352
- Rasch EM, Balsano JS (1973) Cytogenetic studies of *Poecilia* (Pisces). III. Persistence of triploid genomes in the unisexual progeny of triploid females associated with *Poecilia formosa*. *Copeia* **4**: 810-813
- Rasch EM, Balsano JS (1974) Biochemical and cytogenetic studies of *Poecilia* from eastern Mexico. II. Frequency, perpetuation, and probable origin of triploid genomes in females associated with *Poecilia formosa*. *Revista de biologia tropical* **21**: 351-381
- Rasch EM, Balsano JS (1989) Trihybrids related to the unisexual molly fish, *Poecilia formosa*. In *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*, Dawley RM, Bogart JP (eds) pp 252-267. New York State Museum, Albany, New York
- Rasch EM, Darnell RM, Kallman KD, Abramoff P (1965) Cytophotometric evidence for triploidy in hybrids of the gynogenetic fish, *Poecilia formosa*. *J. Exp. Zool.* **160**: 155-169

- Rasch EM, Monaco PJ, Balsano JS (1982) Cytophotometric and autoradiographic evidence for functional apomixis in a gynogenetic fish, *Poecilia formosa*, and its related, triploid unisexuals. *Histochemistry* **73**: 515-533
- Rasch EM, Prehn LM, Rasch RW (1970) Cytogenetic studies of *Poecilia* (Pisces). II. Triploidy and DNA levels in naturally occurring populations associated with the gynogenetic Teleost, *Poecilia formosa* (Girard). *Chromosoma* **31**: 18-40
- Rasmussen SW (1977) Meiosis in *Bombyx mori* females. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci* **277**: 343-350
- Redfield RJ (1994) Male mutation rates and the cost of sex for females. *Nature* **369**: 145-147
- Rishi KK (1989) Current status of fish cytogenetics. In *Fish Genetics in India*, Das P, Jhingran AG (eds) pp 1-20. Today and Tomorrow Publishers, New Delhi
- Rosen DE, Tucker A (1961) Evolution of the secondary sexual characters and sexual behavior pattern in a family of viviparous fishes (Cyprinodontiformes: *Poeciliidae*). *Copeia* **2**: 201-212
- Rosen DE, Bailey RM (1963) The poeciliid fishes (Cyprinodontiformes), their structure, zoogeography, and systematics. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **126**: 1-176
- Ryan MJ, Dries LA, Batra P, Hillis DM (1996) Male mate preferences in a gynogenetic species complex of Amazon mollies. *Animal Behavior* **52**: 1225-1236
- Sapre AB, Deshpande DS (1987) Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. *Journal of Heredity* **78**: 191-196
- Schartl A, Hornung U, Nanda I, Wacker R, Muller-Hermelink HK, Schlupp I, Parzefall J, Schmid M, Schartl M (1997) Susceptibility to the development of pigment cell tumors in a clone of the Amazon molly, *Poecilia formosa*, introduced through a microchromosome. *Cancer Res.* **57**: 2993-3000
- Schartl M (1990) Homology of melanoma-inducing loci in the genus *Xiphophorus*. *Genetics* **126**: 1083-1091
- Schartl M (1995) Platyfish and swordtails: a genetic system for the analysis of molecular mechanisms in tumor formation. *Trends Genet.* **11**: 185-189
- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Parzefall J, Schmid M, Epplen JT (1990) Genetic variation in the clonal vertebrate *Poecilia formosa* is limited to few truly hypervariable loci. *Fingerprint news* **2**: 22-24
- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmid M, Parzefall J (1995b) Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature* **373**: 68-71
- Schartl M, Schlupp I, Schartl A, Meyer MK, Nanda I, Schmid M, Epplen JT, Parzefall J (1991) On the stability of dispensable constituents of the eukaryotic genome: Stability of coding sequences versus truly hypervariable sequences in a clonal vertebrate, the amazon molly, *Poecilia formosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8759-8763

- Schartl M, Wilde B, Schlupp I, Parzefall J (1995a) Evolutionary origin of a parthenoform, the Amazon molly *Poecilia formosa*, on the basis of a molecular genealogy. *Evolution* **49**: 827-835
- Schermelleh L, Thalhammer S, Heckl W, Posl H, Cremer T, Schutze K, Cremer M (1999) Laser microdissection and laser pressure catapulting for the generation of chromosome-specific paint probes. *Biotechniques* **27**: 362-367
- Schlupp, I. (1995) Biologie und Ökologie der Weibchenart *Poecilia formosa* (Girard 1859) (*Poeciliidae*, Teleostei). Dissertation, Universität Hamburg
- Schlupp I, Marler C, Ryan MJ (1994) Benefit to male sailfin mollies of mating with heterospecific females. *Science* **263**: 373-374
- Schlupp I, Nanda I, Döbler M, Lamatsch DK, Epplen JT, Parzefall J, Schmid M, Schartl M (1998) Dispensable and indispensable genes in an ameiotic fish, the Amazon molly *Poecilia formosa*. *Cytogenet. Cell Genet.* **80**: 193-198
- Schlupp I, Parzefall J, Epplen JT, Nanda I, Schmid M, Schartl M (1992) Pseudomale behaviour and spontaneous masculinization in the all-female teleost *Poecilia formosa* (Teleostei: *Poeciliidae*). *Behaviour* **122**: 88-104
- Schlupp I, Parzefall J, Schartl M (1991) Male mate choice in mixed bisexual/unisexual breeding complexes of *Poecilia* (Teleostei; *Poeciliidae*). *Ethology* **88**: 215-222
- Schmid M, Steinlein C (1991) Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. *Chromosoma* **101**: 123-132
- Schröder JH (1964) Genetische Untersuchungen an domestizierten Sämlingen der Gattung *Mollinesia* (*Poeciliidae*). Duncker & Humblot, Berlin
- Schröder JH, Rodriguez CM, Siegmund R (1996) Male size polymorphism in natural habitats of *Poecilia (Limia) perugiae* (Pisces: *Poeciliidae*) endemic to hispaniola. *Biologisches Zentralblatt* **115**: 315-327
- Schultz RJ (1969) Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (*Poeciliidae*) and other vertebrates. *American Naturalist* **103**: 605-619
- Schultz RJ (1977) Evolution and ecology of unisexual fishes. *Evolutionary Biology* 277-331
- Schultz RJ (1979) Role of polyploidy in the evolution of fishes. *Basic Life Sci.* **13**: 313-340
- Schultz RJ, Fielding E (1989) Fixed genotypes in variable environments. In *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*, Dawley RM, Bogart JP (eds) pp 32-38. New York State Museum, Albany, New York
- Schultz RJ, Kallman KD (1968) Triploid hybrids between the all-female teleost *Poecilia formosa* and *Poecilia sphenops*. *Nature* **219**: 280-282

- Sharbel TF, Green DM, Houben A (1998) B chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* **41**: 14-22
- Sola L, Galetti PM, Jr., Monaco PJ, Rasch EM (1997) Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. VI. Additional nucleolus organizer region chromosomal clones of *Poecilia formosa* (Amazon molly) from Texas, with a survey of chromosomal clones detected in the Amazon molly. *Heredity* **78**: 612-619
- Sola L, Monaco PJ, Rasch EM (1990) Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. I. C-bands, Ag-NOR polymorphisms, and sex chromosomes in three populations of *Poecilia latipinna*. *Cytogenet. Cell Genet.* **53**: 148-154
- Solari AJ, Fechheimer NS (1988) Quadrivalent formation in a tetraploid chicken oocyte. *Genome* **30**: 900-902
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-517
- Spolsky CM, Phillips CA, Uzzell T (1992) Antiquity of clonal salamander lineages revealed by mitochondrial DNA. *Nature* **356**: 706-708
- Stearns SC (1983) The evolution of sex and its consequences. Birkhäuser Verlag, Basel
- Stöck M, Grosse WR (1997) Erythrocyte size and ploidy determination in green toads (*Bufo viridis* complex) from Middle Asia. *Alytes (Paris)* **15**: 72-90
- Strommen CA, Rasch EM, Balsano JS (1975b) Cytogenetic studies of *Poecilia* (Pisces) V. Cytophotometric evidence for the production of fertile offspring by triploids related to *Poecilia formosa*. *Journal of Fish Biology* **7**: 667-676
- Strommen CA, Rasch EM, Balsano JS (1975a) Cytogenetic studies on *Poecilia* (Pisces). IV. Epithelial cell biopsies to identify triploid females associated with *Poecilia formosa*. *Copeia* **3**: 568-572
- Suomalainen E, Saura A, Lokki J (1987) Cytology and evolution in parthenogenesis. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Tabata K (1995) Reduction of female proportion in lower growing fish separated from normal and feminized seedlings of Hirame, *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* **61**: 199-201
- Theodorakis CW (1989) Size segregation and the effects of oddity on predation risk in minnow schools. *Animal Behaviour* **38**: 496-502
- Turner BJ (1982) The evolutionary genetics of a unisexual fish, *Poecilia formosa*. *Prog. Clin. Biol. Res.* **96**: 265-305
- Turner BJ, Balsano JS, Rasch EM (1983) Clonal diversity and evolutionary dynamics in a diploid-triploid breeding complex of unisexual fishes (*Poecilia*). *Evolution* **37**: 798-809
- Turner BJ, Brett BH, Miller RR (1980) Interspecific hybridization and the evolutionary origin of a gynogenetic fish, *Poecilia formosa*. *Evolution* **34**: 917-922

- Turner BJ, Elder JF, Jr., Laughlin TF, Davis WP (1990) Genetic variation in clonal vertebrates detected by simple-sequence DNA fingerprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5653-5657
- Turner BJ, Steeves HR (1989) Induction of spermatogenesis in an all-female fish species by treatment with an exogenous androgen. In *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*, Dawley RM, Bogart JP (eds) pp 113-122. New York State Museum: Albany, New York
- Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212
- Varmus H, Weinberg RA (1994) Gene und Krebs - Biologische Wurzeln der Tumorentstehung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Vielkind U, Schlage W, Anders F (1977) Melanogenesis in genetically determined pigment cell tumors of platyfish and platyfish-swordtail hybrids: correlation between tyrosine activity and degree of malignancy. *Z. Krebsforsch. Klin. Onkol. Cancer Res Clin. Oncol.* **90**: 285-299
- Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI (1983) Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. *Cytometry* **3**: 328-331
- Vinogradov AE (1998) Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship. *Cytometry* **31**: 100-109
- Volckaert FAM, Galbusera BAS, van den Heute C, Vanstaen D, Ollevier F (1994) Gynogenesis in the African catfish (*Clarias gariepinus*). I. Induction of meiogynogenesis with thermal and pressure shocks. *Aquaculture* **128**: 221-233
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de LT, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414
- Vrijenhoek RC (1978) Coexistence of clones in a heterogeneous environment. *Science* **199**: 549-552
- Vrijenhoek RC (1979) Factors affecting clonal diversity and coexistence. *American Zoologist* **19**: 787-797
- Vrijenhoek RC (1989) Genetic and ecological constraints on the origins and establishment of unisexual vertebrates. In *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*, Dawley RM, Bogart JP (eds) pp 24-31. New York State Museum, Albany, New York
- Vrijenhoek RC, Dawley RM, Cole CJ, Bogart JP (1989) A list of the known unisexual vertebrates. In *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*, Dawley RM, Bogart JP (eds) pp 19-23. New York State Museum, Albany, New York
- Wallace H, Badawy GM, Wallace BM (1999) Amphibian sex determination and sex reversal. *Cell Mol. Life Sci.* **55**: 901-909
- West SA, Lively CM, Read AF (1999) A pluralistic approach to sex and recombination. *Journal of Evolutionary Biology* **12**: 1003-1012

Wetherington JD, Schenck RA, Vrijenhoek RC (1989) The origins and ecological success of unisexual *Poeciliopsis*: the frozen niche-variation model. In Ecology and evolution of livebearing fishes (*Poeciliidae*), Meffe GK, Snelson FFJ (eds) pp 259-275. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ

Williams GC (1966) Adaptation and natural selection. Princeton University Press, Princeton, NJ

Williams GC (1975) Sex and evolution. Princeton University Press, Princeton, NJ

Williams GC (1992) Natural selection. Oxford University Press, Oxford

11 Publikationen

LAMATSCH DK, SHARBEL TF, MARTIN R, BOCK C (1998): A drop technique for flatworm chromosome preparation for light microscopy and high-resolution scanning electron microscopy. *Chromosome Research* **6**:654-656

SCHLUPP I, NANDA I, DÖBLER M, LAMATSCH DK, EPPLEN JT, PARZEFALL J, SCHMID M, SCHARTL M (1998). Dispensable and indispensable genes in an ameiotic fish, the Amazon molly *Poecilia formosa*. *Cytogenetics and Cell Genetics* **80**:193-198

LAMATSCH DK, STEINLEIN C, SCHMID M, SCHARTL M (2000). Non-invasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: detection of triploid *Poecilia formosa*. *Cytometry* **39**:91-95.

LAMATSCH DK, NANDA I, EPPLEN JT, SCHMID M, SCHARTL M (2000): Unusual triploid males in a microchromosome carrying clone of the amazon molly, *Poecilia formosa*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **91**:148-156

STÖCK M, LAMATSCH DK, STEINLEIN C, EPPLEN JT, GROSSE WR, HOCK R, KLAPPERSTÜCK T, SCHEER U, SCHMID M, SCHARTL M: Discovery of a bisexually reproducing all-triploid vertebrate, zur Veröffentlichung eingereicht

Konferenzbeiträge:

LAMATSCH DK, STEINLEIN C, SCHMID M, SCHARTL M (1997): Detection of triploid individuals in *Poecilia formosa* – a non invasive method for population screening. Programm des 10. Heidelberger Zytometrie Symposiums

12 Danke!

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Manfred Scharl, der es mir ermöglichte, unter seiner Leitung ein sehr spannendes und besonders vielseitiges Thema zu bearbeiten. Zudem möchte ich ihm für die Anregungen und Hilfestellungen danken, die für das Fortschreiten dieser Arbeit unentbehrlich waren und dafür, daß er sich stets Zeit nahm für Fragen und Probleme.

Bei Prof. Dr. Michael Schmid möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Seine stete Begeisterung für ungewöhnliche Fortpflanzungsmodi bei Würmern und Fischen haben mich zu dieser Arbeit gebracht.

Marion Döbler danke ich für die vielen anregenden Diskussionen über „Männer“, ihre Unterstützung bei der Datenaufnahme und statistischen Auswertung der Verhaltensversuche, sowie der durchflußzytometrischen Analyse des Flossenmaterials. Ihre Hilfe im Freiland war unverzichtbar. Für die Hilfe im Freiland bedanke ich mich ebenfalls bei Prof. Dr. Jakob Parzefall, Kay Körner, Ingo Schlupp und Dirk Möller.

Bei Matthias Stöck bedanke ich mich für die vielen interessanten und aufschlußreichen Diskussionen sowie für die wertvollen Kommentare zu der vorliegenden Arbeit.

Bei Claus Steinlein möchte ich mich für seine stete Hilfsbereitschaft und die erfahrene Anleitung in zytogenetischen Techniken bedanken. Indrajit Nanda danke ich für den ersten Kontakt mit *P. formosa* und seine Hilfestellungen und Diskussionsbereitschaft. Christian Ziegler hat viel Zeit in die in-situ-Hybridisierungen investiert – danke! Auch bei dem restlichen Team der Humangenetik – Andrea Buwe, Wolfgang Feichtinger, Martina Guttenbach, Gitta Hesse und Noémi Reissmann – möchte ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bei Georg Schneider, Hugo Schwind und Petra Weber bedanke ich mich herzlich für die reibungslose Zucht der Fische, sowie für ihre Geduld und Unterstützung. Robin Wacker danke ich für die Anfertigung der histologischen Präparate. Bei Prof. Dr. J.T.

Epplen möchte ich mich für die Anfertigung der Multilocus DNA-Fingerprints bedanken. Prof. Krohne und Claudia Gehrig danke ich für die Möglichkeit, elektronenmikroskopische Bilder anzufertigen.

Bei allen „Schartl´s“ möchte ich mich für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor und die große Kollegialität bedanken. Ute und Heidrun danke ich besonders für das Erlernen von Techniken sowie ihre Hilfestellungen bei Schwierigkeiten in der Methodik. Bei Petra möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchflußzytometrie und in der Zellkultur bedanken. Eva danke ich für ihre wertvolle Hilfe in der Endphase.

Bei meiner Mutter bedanke ich mich für ihre große Unterstützung sowie dafür, daß sie stets meine Entscheidungen akzeptierte und meine Arbeit mit Interesse verfolgte. Für die paternale Introgression sowie die großzügige emotionale und finanzielle Zuwendung bedanke ich mich bei meinem Vater, ohne den diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre.

Bei Chris möchte ich mich für sein Verständnis nicht nur für meine nächtlichen Arbeitseinsätze und seine große Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs „Regulation des Zellwachstums“ gefördert.

13 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Dunja K. Lamatsch
Geburtsdatum	10. Januar 1970
Geburtsort	Kempfen/Huels
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung:

1976 – 1980	Grundschule am Pfanzeltplatz, München
1980 – 1989	Michaeli-Gymnasium München
Juni 1989	Abitur

Hochschulausbildung:

1989 bis 1996	Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Juni 1996	Diplom Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie Seewiesen in der Nachwuchs-gruppe von Dr. N. Michiels. Thema: Untersuchung zur Diploidisierung der männlichen Keimbahn bei triploiden Strudelwürmern (<i>Dugesia polychroa</i>)
bis September 1996	Projekt in Zusammenarbeit mit Dr. Regina Martin am Botanischen Institut, LMU München. Thema: „A drop technique for flatworm chromosome preparation for light microscopy and high-resolution scanning electron microscopy“

bis Dezember 1996

Projekt bei Dr. Christian Schlötterer am Institut für Tierzucht und Genetik, VMU Wien. Thema: Evolution von Mikrosatelliten bei *Drosophila*: Cross-species amplification

seit Januar 1997

Dissertation am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Manfred Scharl.

Titel: „Molekulargenetische und zytogenetische Untersuchungen zur paternalen Introgression bei *Poecilia formosa*“

14 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und dabei keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß die vorliegende Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 23.01.01

A handwritten signature in black ink, reading "Dunja Lamatsch". The signature is written in a cursive style with a large initial 'D' and a stylized 'L'.

Dunja Lamatsch

Schwanger vom Knutschen

Idstein: Richter schließt auch Jungfernzeugung nicht aus

Von Sabine Krischke

IDSTEIN. Sachen gibt's, die gibt's nicht. Oder besser: Manche Sachen sind so unglaublich, dass allein der Glaube hilft. Dazu gehören Dinge wie „unbefleckte Empfängnis“ oder „jungfräuliche Geburt“. Eine Gnade, die bislang nur einer Frau zu Teil wurde – und die schwebt bekanntlich hoch über allem Weltlichen und ist über jedes menschliche Urteil erhaben. Wenn aber eine Frau irdischer Herkunft behauptet, schwanger geworden zu sein, ohne Geschlechtsverkehr gehabt zu haben, dann zweifelt das Volk. – Zu Unrecht. So hat Anfang August Fritz Henge, Richter am Amtsgericht in Idstein (Rheingau-Taunus-Kreis) entschieden: „Es ist zwar der Regelfall, dass Schwangerschaften – von künstlichen Befruchtungen abgesehen – durch die Vollziehung des Geschlechtsaktes zustande kommen“, führt der Richter in seinem Beschluss aus, der der *FR* vorliegt. Doch es gebe Ausnahmen. Frau könne auch vom bloßen Herumknutschen mit einem Mann schwanger werden – vorausgesetzt beide sind nackt. Dies sei „wissenschaftlich ebenso wenig auszuschließen, wie das sehr seltene Phänomen der Parthenogenese, auf welchem immerhin die Kulturgeschichte des christlichen Abendlandes zu einem nicht unerheblichen Teil beruht“, so Henge weiter. Parthenogenese heißt Jungfernzeugung. Und ist wissenschaftlich bislang nur für die Insektenwelt und wenig hochentwickelte Arten bewiesen: Stabheuschrecken, bestimmte Würmerarten und Rädertierchen. Aber der Homo Sapiens? Im Taunusstädtchen Idstein soll sich im Jahr 1986 ein solches Wunder ereignet haben. Bekannt wurde es elf Jahre später.

Eine Vaterschaftsklage aus dem Jahr 1997 brachte das Unglaubliche ans Licht. Bestätigt wurde es allerdings erst jetzt durch Richter Henge. Begonnen hatte die Geschichte ganz profan, als eine Trennungsgeschichte.

Herr A., nennen wir ihn so, aus Sulzbach (Main-Taunus-Kreis) war einst mit Frau A. verheiratet und lebte in Idstein. Drei Kinder gingen aus der Ehe hervor, zwei Töchter und ein Sohn, heute 13 Jahre alt. Das Ehepaar stritt sich, lebte seit 1994 in Trennung und ist seit 1998 offiziell geschieden. Im Jahr 1997 war Herr A. von einer Bekannten zugetragen worden, dass sie 1986 beobachtet habe, wie sei-

ne damalige Gattin mit einem fremden Mann in einem Idsteiner Hotel verschwunden sei. Da der Sohn just in diesem Jahr gezeugt wurde, kam A. der Verdacht, dass ihm ein Kuckucksei ins Nest gelegt wurde. Zu Recht. Zwar behauptete seine Ex-Frau vor Gericht steif und fest, dass sie in der Zeugnungszeit „ausschließlich mit ihrem Ehegatten geschlechtlich verkehrt hat“.

Ein DNA-Test ergab, dass A. nicht der Vater des Jungen sein kann. Das erboste den Ex-Gatten sehr. Nicht nur, dass ihm Hörner aufgesetzt worden waren. Er hatte an seine Ex-Frau jahrelang Unterhaltsgeld für das Kind eines fremden Mannes gezahlt. Da sich A. sicher war und ist, dass Kinder nicht vom Himmel fallen, erstattete er Anzeige gegen seine Ex-Frau wegen „uneidlicher Falschaussage“. Ein Vergehen, das mit einer Haftstrafe von drei Monaten bis zu fünf Jahren bestraft wird. Die Anzeige landete bei der Staatsanwaltschaft Wiesbaden. Die stellte Antrag auf Eröffnung eines Verfahrens gegen die Idsteinerin, der – hier schließt sich der Kreis – von Richter Henge mit oben zitierter Begründung abgewiesen wurde.

Er folgte damit in allen Punkten der Argumentation der Anwälte von Frau A., die dem Beschluss beiliegt. Darin heißt es, dass die Angeschuldigte zwar tatsächlich 1986 mit „einem Herrn aus Hamburg“ in einem Idsteiner Hotel abgestiegen sei, dort aber lediglich mit selbigem „unbekleidet herumgeknutscht“ habe. Zum Geschlechtsakt sei es nicht gekommen, auch zu keiner Ejakulation. Woraus die Anwälte ableiten: Frau A. wurde wohl beim Herumknutschen befruchtet, ohne dass „eine Penetration und erkennbarer Samenerguss des Mannes stattgefunden hat“.

Ein klarer, wenn auch sehr seltener Fall von Parthenogenese. Ein medizinisches Gutachten holte Richter Henge in dieser Sache nicht ein. Das bestätigt Rainer Wild, Pressesprecher des Amtsgerichts Idstein, der *FR*. Der Richter habe sich auf „eigenen Sachverstand“ gestützt – was der Staatsanwaltschaft Wiesbaden genügte. Herrn A. nicht. Der versteht die Welt nicht mehr und zum Lachen ist ihm schon gar nicht zumute. Hatte er doch die Hoffnung, dass im Zuge des Prozesses die Identität des „Herrn aus Hamburg“ ermittelt würde, dem er allzu gern eine saftige Rechnung präsentiert hätte. Im Fall einer unbefleckten Empfängnis ist das natürlich nicht möglich.