

Genetische Unterschiede zwischen den Unterarten des Breitmaulnashorns von Matthew George, Jr.; Lydia A. Puentes und Oliver A. Ryder

Einführung

In den letzten Jahren sind die Populationen des südlichen Breitmaulnashorns (*Ceratotherium simum simum*) und des nördlichen Breitmaulnashorns (*Ceratotherium simum cottoni*) stark zusammengeschmolzen. Die Zahl der südlichen Breitmaulnashörner wird zur Zeit von der IUCN-SSC auf etwa 3000 Individuen geschätzt und die der nördlichen Breitmaulnashörner auf etwa 700 (Cryx, 1982).

Obwohl diese beiden geographischen Formen in einer Entfernung von 2000 Meilen vorkommen, ist die Einteilung in zwei gesonderte Unterarten immer noch umstritten. Wie Groves (1972) beschreibt, behalten die südlichen Breitmaulnashörner ihre Körperbehaarung über die gesamte Lebensspanne und haben zudem eine längere Zahnreihe und eine tiefere Höhlung des Schädels als das nördliche Breitmaulnashorn. Hoojier (1969) sagt hierzu, daß die bis jetzt bekannten unterschiedlichen Merkmale eine Unterteilung in verschiedene Unterarten nicht rechtfertigen. Wir sind nun mit unseren Untersuchungen in den Molekülbereich gegangen, um die Beziehung zwischen der Genetik und der Evolution beider geographischer Formen des Breitmaulnashorns mit dem Spitzmaulnashorn zu vergleichen.

Für die Untersuchung des oben genannten Problems gibt es viele genetische und biochemische Techniken. Wir hatten uns entschlossen, mitochondriales DNS für die Untersuchung zu benutzen. Das meiste des in den Zellen vorhandenen DNS befindet sich in den Chromosomen, jedoch existiert auch in Mitochondrien DNS (Mitochondrien sind Organellen, die die Zellen mit Energie versorgen). Das mitochondriale DNS (mtDNS) ist ein kleines, rundes Molekül, dessen Strukturen und Charakteristika sich von denen des chromosomalen DNS unterscheiden (Borst und Grivell, 1981). Die Benutzung von mitochondrialem DNS für vergleichende Untersuchungen hat zwei Vorteile:

1. Das Molekül wird mütterlicherseits vererbt, so daß Komplikationen aufgrund väterlicher Beigaben und Rekombinationsabläufen vermieden werden (David und Blackler, 1972; Hutchinson et al., 1974).
2. Das Molekül entwickelt sich schnell.

Daher kann man Unterschiede bei der Benutzung von mitochondrialem DNS feststellen, die mit anderen Techniken nicht entdeckt werden können (Brown et al., 1979). Diese beiden Eigenschaften sind sehr nützlich bei der Untersuchung verwandter Arten.

Material und Methoden

Das mitochondriale DNS wurde aus der Leber und dem Milzgewebe von jedem der drei Nashornotypen isoliert. Bei Aufbereitung mit der Differenzialzentrifugation läßt sich mitochondriales DNS leicht isolieren und reinigen (Brown et al., 1979; Lansman et al., 1981). Nach der Reinigung wurden die betreffenden mtDNS einer Serie verschiedener Spaltenzyme ausgesetzt. (Diese Enzyme erkennen spezifische Sequenzen im DNS und trennen die DNS-Kette an spezifischen Punkten.) Die gespaltenen Fragmente werden elektrophoretisch getrennt. Anschließend werden die Wandermuster der Fragmente im Gel analysiert. Die Arten, die einen größeren Anteil identisch wandernder Fragmente gemeinsam haben, sind miteinander enger verwandt (Upholt und David, 1977; Nei und Li, 1979). Solche Daten erlauben gleichzeitig einen Rückschluß darauf, wann die Arten sich von ihren Vorfahren abgespalten haben (Brown et al., 1979).

Ergebnisse

Das in diesem Versuch benutzte mitochondriale DNS der drei Tiere wurde 21 verschiedenen Enzymen ausgesetzt. In den meisten Fällen waren die Wandermuster der mtDNS-Fragmente des Spitzmaulnashorns verschieden von denen des Breitmaulnashorns. Bei der Untersuchung der Wandermuster des mtDNS der beiden Breitmaulnashörner fanden sich 13 Muster, die identisch waren; die bleibenden acht Muster waren unterschiedlich. Abbildung 2 zeigt den direkten Vergleich von sieben dieser acht unterschiedlichen Wandermuster.

Eine Analyse dieser Daten unter Heranziehung der von Nei und Li 1979 vorgelegten Formeln zeigt, daß die Breitmaulnashörner sich in ihrer Nukleotidsequenz um 4 % voneinander unterscheiden, während die beiden Breitmaulnashörner im Vergleich zu dem Spitzmaulnashorn sich von diesem um 7 % unterscheiden. Mitochondriales DNS von Primaten ändert sich im Laufe von einer Million Jahre um 2 % (Brown et al., 1979). Zieht man dieses Ergebnis bei der Beurteilung des mitochondrialen DNS von Nashörnern heran, so zeigt sich, daß vor zwei Millionen Jahren sich die beiden Formen des Breitmaulnashorns getrennt haben, während Breitmaulnashörner und Spitzmaulnashörner sich schon vor 3 1/2 Millionen Jahren aufgespalten haben. Abbildung 3 zeigt die phylogenetische Beziehung dieser Arten mit der geschätzten Entwicklungszeit.

Diskussion

Jeweils nur ein Individuum beider Formen des Breitmaulnashorns und des Spitzmaulnashorns wurden in dieser Studie analysiert. Daher ist es wünschenswert, solche Untersuchungen mit zusätzlichen Proben weiterer Individuen zu vertiefen. Bis zur Durchführung weiterer Studien erlauben jedoch diese Daten einen

vorläufigen Schluß.

Die zeitliche Divergenz von 3 1/2 Millionen Jahren für Breitmaulnashorn und Spitzmaulnashorn, die wir mit der mitochondrialen DNS-Analyse gefunden haben, stimmt gut mit fossilen Funden überein (Hoojier, 1969). Überraschend war das Ergebnis, daß die beiden geographisch isolierten Breitmaulnashornpopulationen sich schon vor zwei Millionen Jahren getrennt entwickelt haben müssen. Die Analyse des mitochondrialen DNS läßt schließen, daß der Genaustausch gering war und die genetische Isolation zwischen den beiden Breitmaulnashornpopulationen seit zwei Millionen Jahren existiert.

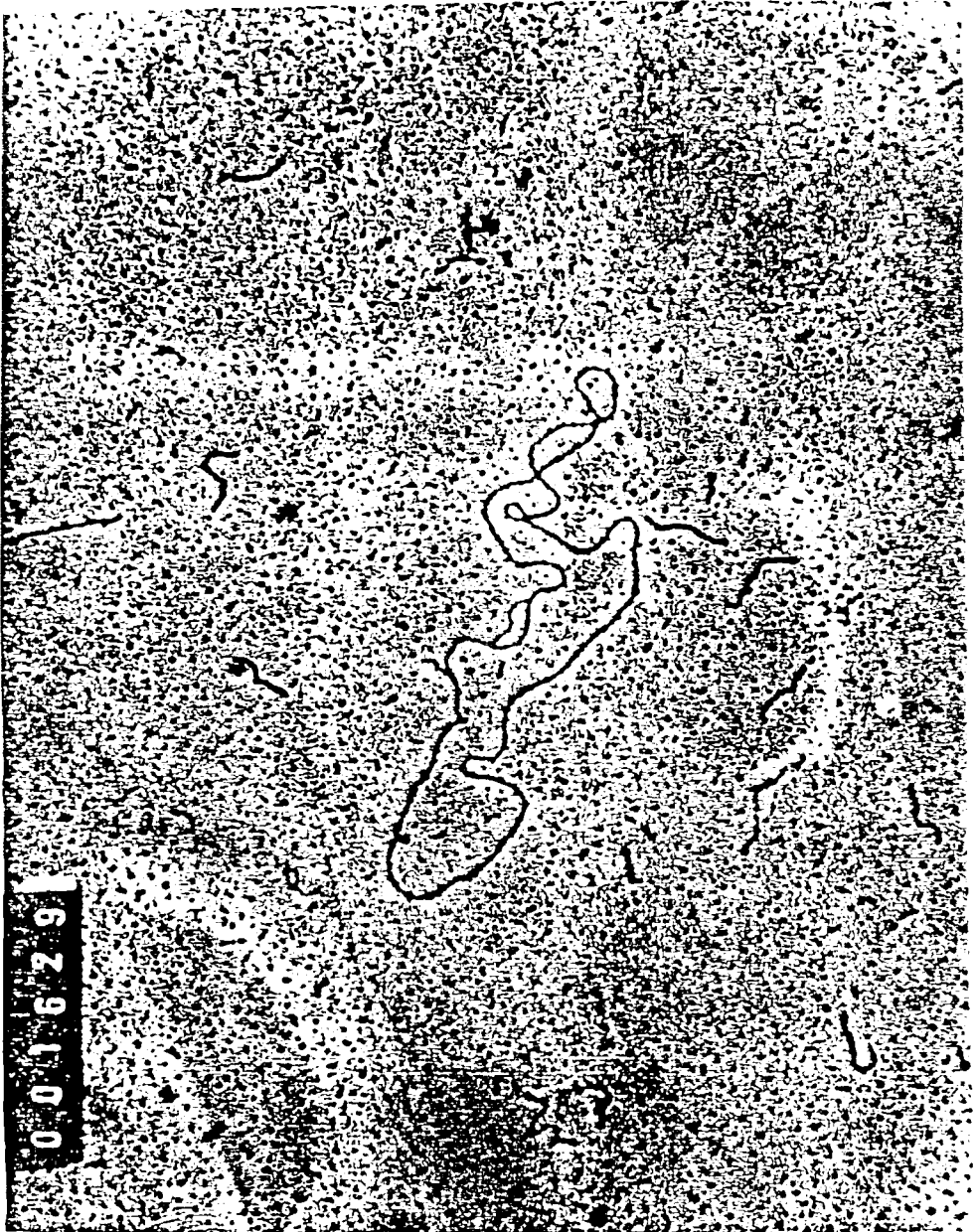
Die intra-spezifische Variation im mitochondrialen DNS, die beim Breitmaulnashorn gefunden wurde, stimmt mit den intra-spezifischen Variationen anderer Arten überein, so bei Makaken (George, 1982), Menschenaffen (Ferris et al., 1981), Nagetieren (Brown und Simpson, 1981) und Schafen und Ziegen (Upholt und David, 1977). Die genetischen Unterschiede von 7 % in der mitochondrialen DNS bei Spitzmaul- und Breitmaulnashorn sind etwas geringer, als sie bei Untersuchungen von mitochondrialem DNS bei anderen Tiergruppen gefunden wurden.

Die mitochondriale DNS-Analyse zeigt signifikante genetische Unterschiede zwischen *Ceratotherium simum simum* und *Ceratotherium simum cottoni*, wogegen deren morphologische Unterscheidung nur gering ist (vielleicht aufgrund ähnlichen Selektionsdruckes oder konvergenter Evolution).

Zur Zeit untersuchen wir das mitochondriale DNS eines zweiten südlichen Breitmaulnashorns und haben bisher nur wenige Unterschiede zu den hier aufgezeigten Proben gefunden.

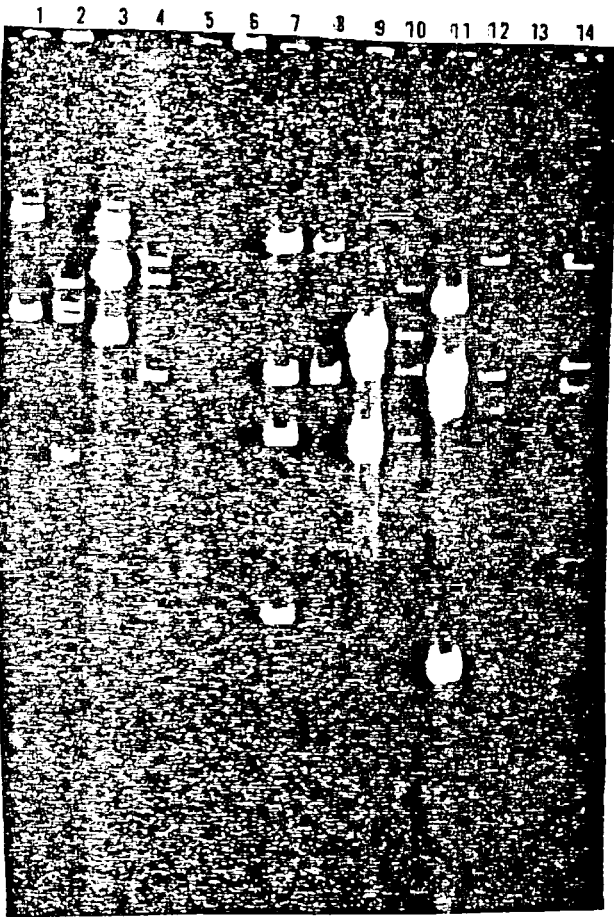
Da die beiden Breitmaulnashorn-Unterarten mit Hilfe der mitochondrialen DNS-Analyse unterschieden werden können, ist es möglich, auch Individuen zu bestimmen, deren Herkunft unsicher ist.

Da jedoch von jeder Nashorngruppe nur je ein Individuum untersucht wurde, müssen die gefundenen Resultate noch weiter erhärtet werden.



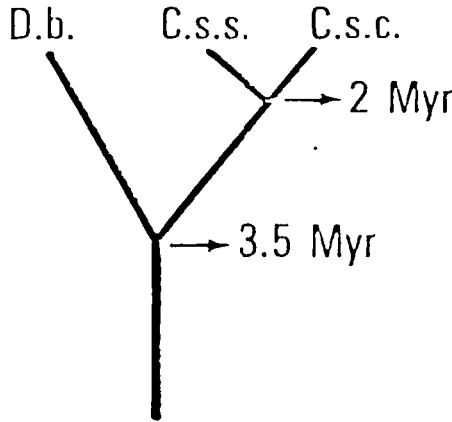
Elektronenmikroskopisches Bild eines mtDNS von Fresbytis entellus

Abbildung 2



Unterschiede des mtDNS bei südlichen und nördlichen Breitmaulnas-
hörnern. Die mtDNS-Muster der nördlichen Form werden von den Linien
1, 3, 5, 7, 9, 11 und 13 gezeigt, die anderen Linien betreffen die
südliche Form

Abbildung 3



Phylogenetische Beziehungen der Nashornarten. D.b. = Spitzmaulnashorn, C.s.s. = südliches Breitmaulnashorn, D.s.c. = nördliches Breitmaulnashorn. Die geschätzten Aufspaltungszeiten sind angegeben.

Tabelle 1

Enzyme	nördliches Breitmaulnashorn	südliches Breitmaulnashorn	Spitzmaulnashorn
BamH-I	A(2)	A(2)	B(3)
BstE II	C(2)	C(2)	C(2)
Pvu II	D(6)	E(4)	F(3)
Bgl II	G(2)	G(2)	H(2)
FnuD II	I(5)	I(5)	J(7)
Sst I	K(2)	K(2)	L(1)
Acc I	M(4)	N(5)	O(5)
Hpa I	P(4)	Q(3)	Q(3)
Hinc II	R(10)	S(6)	T(10)
Ava I	U(2)	V(4)	U(2)
Hind III	W(4)	X(4)	Y(4)
Pst I	Z(1)	Z(1)	-b
EcoR I	-	-	A'(4)
Kpn I	-	-	-
Xho I	-	-	-
Xba I	-	B'(4)	C'(4)
Hae III	D'(28)	E'(28)	F'(24)
Hinf I	G'(14)	G'(14)	H'(13)
Hpa II	I'(11)	I'(11)	J'(13)
Taq I	nd ^c	nd	nd
Mbo I	nd	nd	nd

Die Tabelle zeigt die mtDNS Fragmentmuster der drei untersuchten Nashörner. Diese Muster entstanden nach Behandlung des mtDNS mit 21 verschiedenen Enzymen. Sie sind alphabetisch bezeichnet; die Zahlen in Klammern geben die Zahl der bei jeder Enzymbehandlung entstandenen Fragmente an. Striche weisen darauf hin, daß das mtDNS vom Enzym nicht aufgebrochen werden konnte. Nicht zu bestimmende Muster werden mit nd gekennzeichnet.

Summary

This paper presents the initial results of a comparative study of genetic differences found between the Northern white rhino (*Ceratotherium simum cottoni*) and the Southern white rhino (*Ceratotherium simum simum*). In addition to these two subspecies, the Black rhino (*Diceros bicornis*) was also examined. Mitochondrial DNA (mtDNA) was used as an evolutionary probe to determine the relatedness of the two subspecies of white rhinos, as well as their relationship to the black rhino. The comparative analysis revealed that the white rhinos differ by approximately 4 % in their genetic makeup (nucleotide sequence) and that they both differ from the black rhino by approximately 7 %. These results indicate that the white rhino subspecies last shared a common ancestor at least two million years ago and that it has been approximately three and one-half million years since they shared a common ancestor with the black rhino. The times of divergence reported here are consistent with those reported from fossil studies and provides us with another confirmation of the usefulness of mitochondrial DNA when used as an evolutionary tool.

Literatur

- Anonym (1982): Elephants and rhinos in Africa. *Oryx* 16, 274.
- Borst, P. und Grivell, L. A. (1981): Small is beautiful: Portrait of a mitochondrial genome. *Nature* 290, 439-440.
- Brown, G. und Simpson, M. (1981): Intra- and interspecific variation of the mitochondrial genome in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*: Restriction enzyme analysis of variant mitochondrial DNA molecules and their evolutionary relationships. *Genetics* 97, 125-143.
- Brown, W. M., M. George und A. C. Wilson (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1967-1974.
- David, I. B. und A. W. Blackler (1972): Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 29, 152-161.
- Ferris, S., W. M. Brown, W. Davidson und A. C. Wilson (1981): Extensive polymorphism in the mitochondrial DNA of apes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6319-6323.
- George, Jr., Matthew (1982): Mitochondrial DNA evolution in Old World monkeys. PhD Thesis (Dissertation), University of California, Berkley, CA.
- Groves, C. P. (1972): *Ceratotherium simum*. *Mammalian Species* 3, 1-6.
- Hoojier, D. A. (1969): Pleistocene East African rhinoceroses. In: *Fossil Vertebrates of Africa* (L. S. B. Leakey, ed.) vol. 1, 71-98.
- Hutchison, III, C. A., J. E. Newbold, S. S. Potter und M. H. Edgell (1974): Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251, 536-539.

- Lansman, R., R. Shade, J. Shapiro und J. Awise (1981): The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. *J. Mol. Evol.* 17, 214-226.
- Nei, M. und W.-H. Li (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5269-5273.
- Upholt, W. B. und David, I. B. (1977): Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goat - rapid evolution in the D-loop region. *Cell* 11, 571-583.

Anschrift der Verfasser:

Matthew George Jr.

Lydia A. Puentes

Oliver A. Ryder

Zoological Society of San Diego

P. O. Box 551

San Diego, CA 92112/USA