

## Molekulare Ökologie in der Forstentomologie

Christian Stauffer, Dimitrios N. Avtzis & Wolfgang Arthofer

Institut für Forstentomologie, Forstpathologie & Forstschutz, Universität für Bodenkultur, Wien

**Abstract** The term *Molecular Ecology* appeared after the discovery that DNA can be amplified *in-vitro* by PCR in the late 1980's. *Molecular Ecology* can be defined as the scientific field that combines genetic techniques, population genetics and genomics with ecological relevant questions. Since then, many papers have been published in *Molecular Ecology*. Here we present some examples focusing on Palaearctic scolytid species.

**Key Words:** Scolytinae, phylogeography, phylogenetics, mtDNA

Prof. Dr. Christian Stauffer, Dr. Dimitrios N. Avtzis & Dr. Wolfgang Arthofer, Department für Wald- & Bodenwissenschaften, Universität für Bodenkultur, 1190 Wien, Österreich.  
E-Mail: christian.stauffer@boku.ac.at.

### Molekulare Ökologie

Nach der Wiederentdeckung der Mendelschen Regeln Anfang des 20. Jahrhunderts waren es unter anderem Theodosius Dobzhansky und Ernst Mayr, die Evolution erstmals durch die Analyse von Populationen untersuchten. Bis 1980 wurden für diese populationsgenetischen Analysen morphologische, cytologische und enzymelektrophoretische Marker verwendet. Durch die Entdeckung der PCR wurde das Arbeiten mit DNA wesentlich erleichtert. Im Laufe der Zeit setzte sich der Begriff *Molekulare Ökologie* durch, mit dem man jenen Bereich beschreiben will, der molekulare Methoden der Populationsgenetik und der Genomanalyse mit ökologischen Fragestellungen verbindet. Genetische Marker können vergangene als auch zur Zeit ablaufende Prozesse aufzeigen. Mit Hilfe solcher Marker kann man einerseits Hinweise auf die Refugialgebiete von Organismen während der letzten Eiszeiten erhalten, andererseits Prozesse wie Genfluß, Selektion oder genetische Drift aufzeigen. Bei den meisten der von uns im Folgenden vorgestellten Arbeiten steht das Sequenzieren mitochondrialer Abschnitte im Vordergrund. Die mitochondriale DNA hat durch ihre im Vergleich zu nuklearer DNA erhöhte Mutationsrate und vereinfachte Genstruktur den Vorteil, bei intraspezifischen Fragestellungen gute Resultate zu erzielen.

### Phylogenetische Arbeiten: *Ips* und *Tomicus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae)

Die Gattung *Ips* stellt in der Forstentomologie eine ökologisch als auch ökonomisch sehr wichtige Organismengruppe dar. Nach der Revision von COGNATO & SPERLING (2000) enthält diese Gattung 36 Arten, wovon 23 in N- und Zentralamerika und 13 in Eurasien vorkommen. In dieser Revision wird die europäische Art *Ips mansfeldi* bereits in die Gattung *Orthotomicus* gestellt. COGNATO & SUN (2007) haben 35 *Ips* Arten mit Hilfe nuklearer, mitochondrialer und morphologischer Marker analysiert. Aus dem Consensus Baum ziehen die Autoren folgende Schlussfolgerungen:

- die *Ips* Arten sind eine monophyletische Gruppe
- die sechs europäischen *Ips*-Arten sind wenig verwandt; die morphologisch ähnlichen Arten *amitinus*, *typographus* und *cembrae* sind polyphyletisch
- in Asien wird *I. shangrilla* als neue Art beschrieben. Morphologisch wurde sie zuerst als *I. duplicatus* eingestuft, doch der Consensus Baum zeigt diese neue Art als Geschwisterart von *I. amitinus*
- man kann eine europäische (*I. cembrae*) und eine asiatische (*I. subelongatus*) Lärchenborkenkäferart unterscheiden, wobei noch unklar ist, wo diese beiden Arten sich treffen – laut STAUFFER & al. (2001) muss dies östlich von Moskau sein.

Eine weitere forstschutzrelevante paläarktische Gruppe in der Unterfamilie Scolytinae ist die Gattung *Tomicus*. Zu dieser gehört der große (*T. piniperda*) und der kleine (*T. minor*) Waldgärtner als auch der mediterrane Waldgärtner *T. destruens*. Letzterer wird oft synonym zu *T. piniperda* gestellt. Bei morphologischen aber auch molekularen Analysen wurde eine deutliche Abgrenzung der beiden Arten gefunden (GALLEGO & GALIÁN 2001, KOHLMAYR & al. 2002, KERDELHUÉ & al. 2003, FACCOLI & al. 2005). DUAN & al. (2004) zeigten, dass *T. piniperda* und die asiatische Art *T. brevipilosus*, und *T. destruens* und *T. minor* Geschwisterarten sind. In dieser Studie konnten die Autoren auch eine weitere neue Art in der chinesischen Provinz Yunnan beschreiben, die vorher in der Literatur als *T. piniperda* geführt war. Beide Studien (DUAN & al. 2004, COGNATO & SUN 2007) lassen vermuten, dass Asien noch einige unbeschriebene Borkenkäferarten enthält.

### **Phylogeographische Arbeiten: *Ips typographus*, *Pityogenes chalcographus* und *Tomicus destruens***

Der Buchdrucker, *Ips typographus*, ist in Europa der aggressivste Fichtenborkenkäfer. In einer genetischen Analyse wurden 18 europäische Populationen untersucht. Von 136 Käfern wurden 560bp des mitochondrialen COI Gens sequenziert (STAUFFER & al. 1999). Acht Haplotypen (HT) wurden definiert, und eine phylogeographische Analyse zeigte, dass sich der Buchdrucker vom Süden nach Norden ausgebreitet hat. Auf dem russischen Gebiet existiert nur ein HT, der sonst nirgends gefunden wurde. Mit Hilfe der nuklearen Mikrosatelliten erhält man jedoch ein anderes Bild (SALLÉ & al. 2007): Es gibt nur wenig Unterschied zwischen den Populationen und man erkennt einen hohen Genfluss. Die Ursache für diese Diskrepanz zwischen mitochondrialen und nuklearen Daten ist sehr wahrscheinlich ein unterschiedliches Migrationsverhalten von Weibchen und Männchen.

Beim Kupferstecher, *Pityogenes chalcographus*, wurde Mitte der 1970iger Jahre Rassendifferenzierung aufgrund von Kreuzungsversuchen zwischen skandinavischen und mitteleuropäischen Populationen festgestellt (FÜHRER 1976). ARTHOFER & al. (2007a) und AVTZIS (2006) haben 39 europäische Populationen bzw. 653 Individuen gesammelt und etwa 1600bp des COI Gens analysiert. Dabei konnten 58 HT definiert werden, die sich in 6 phylogenetische Gruppen mit einer maximalen Sequenzdivergenz von 2,33% einteilen lassen. Wenn man die HT auf eine europäische Karte einträgt, erkennt man, dass etwa 90% der analysierten Individuen in 2 Gruppen zu finden sind, wobei eine der beiden den Schwerpunkt in Nordeuropa hat. Drei Gruppen waren ausschließlich in Norditalien und eine Gruppe vor allem auf dem Balkan aufzufinden. Die Verbreitungsgeschichte der Fichte spiegelt sich hier sehr gut in der maternal vererbten mtDNA des Kupferstechers wider. Kreuzungsversuche zwischen HT der beiden Hauptclades zeigten verringerte Fekundität. Somit nehmen wir an, dass die beiden Clades heute sympatrisch vorkommen, aber aufgrund der Präferenz für die eigenen HT zu keinem Austausch kommen. Interessant sind zweifelsohne die südlichen Clades, deren HT leider nicht für Kreuzungsversuche verwendet wurden.

HORN & al. (2006) haben sich erstmals mit einer mediterranen Forstinsektenart beschäftigt – *Tomicus destruens*. 42 Populationen bzw. 219 Individuen wurden mit Hilfe von ca. 600bp der mtDNA analysiert. Es wurden 53 HT definiert, die sich mittels einer Netzwerkanalyse in 2 Gruppen einteilen lassen. Wenn man die HT auf der Karte aufrägt, erkennt man, dass die beiden genetischen Gruppen die geographische Verteilung widerspiegeln. Die HT der beiden Gruppen liegen vorwiegend allopatrisch vor, nur in Italien können HT der beiden Gruppen sympatrisch vorgefunden werden. Im östlichen Teil erkennt man eine weitere Aufteilung in 2 Gruppen zwischen denen kein Genfluß gefunden wurde.

### **Einfluß von *Wolbachia* auf die mtDNA - Ausblick**

In den meisten der hier genannten phylogeographischen Arbeiten wurden mitochondriale Daten analysiert und relativ hohe intraspezifische Variationen entdeckt. Laut HURST & JIGGINS (2005) ist hier Vorsicht geboten, da auch der bakterielle Endosymbiont *Wolbachia* eine Rolle spielen könnte. *Wolbachia* wird wie die mtDNA maternal vererbt und ist häufig in Insekten zu finden. In den meisten Fällen verursacht sie cytoplasmatische Inkompatibilität, die bei Paarungen nicht infizierter Weibchen mit infizierten Männchen keine Nachkommenschaft ergibt. Dies hat zur Konsequenz, dass die mitochondriale DNA infizierter Weibchen gemeinsam mit *Wolbachia* durch die Population driftet und jene nicht infizierter Weibchen verdrängt. Dies kann zu einer Veränderung des mitochondrialen Genpools führen. In den letzten Jahren wurde auch bei Borkenkäfern nach *Wolbachia* gesucht und in einigen Arten wurde man fündig: *Ips typographus* (STAUFFER & al. 1997);

*Hypothenemus coffee* (VEGA & al. 2002); *Xylosandrus germanus* (K. KOIVISTA, pers. Mitteilung); *Coccotrypes dactyliperda* (ZCHORI-FEIN & al. 2006); *P. chalcographus* (ARTHOFFER & al. 2007b).

Genomprojekte sind eine wesentliche Wissenserverweiterung in der molekularen Ökologie. Derzeit sind vier Insektengenome komplett sequenziert z.B. *Apis mellifera* (THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM 2006) und viele weitere sind in Arbeit. Diese werden nicht nur weitere polymorphe nukleare Marker erschliessen, sondern auch selektive Marker für Fragestellungen im intraspezifischen Bereich zur Verfügung stellen. Dadurch werden Fragestellungen wie jene der Existenz ökophysiologischer Reaktionstypen (z.B. obligate Diapausekäfer vs. fakultative Diapausekäfer; Pionierkäfer vs. Restpopulation) künftig leichter beantwortbar.

### Dank

Für die finanzielle Unterstützung bedanken wir uns beim FWF.

### Literatur

- ARTHOFFER, W., AVTZIS, D.N. & STAUFFER, C. (2007a): Targeted primer development and SSCP as an alternative to direct sequencing in phylogenetic analysis of *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera, Scolytidae). – *Electrophoresis* **28**: 1046-1052.
- ARTHOFFER, W., AVTZIS, D.N., RIEGLER, M., MILLER, J.W. & STAUFFER, C. (2007b): Pitfalls in applying mitochondrial markers onto the scolytid species *Pityogenes chalcographus*. – in: BENZ B & RAFFA K (eds.): *Proceedings of a Workshop on Bark Beetle Genetics: Current Status of Bark Beetle Genetic Research*. 2006 May 20-21, Asheville, NC. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-466. Portland, Oregon; US. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. In press.
- AVTZIS, D.N. (2006): Race differentiation of *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera, Scolytinae): An ecological and phylogeographic approach. – PhD Thesis. Boku, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna.
- COGNATO, A.I. & SPERLING, F.A.H. (2000): Phylogeny of *Ips* DeGeer (Coleoptera: Scolytidae) inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I sequence. – *Mol. Phylogenet. Evol.* **14**: 445-460.
- COGNATO, A.I. & SUN, J.H. (2007). DNA taxonomy for *Ips* species (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) and description of a new species from China. – *Cladistics* accepted.
- DUAN, Y., KERDELHUÉ, C., YE, H. & LIEUTIER F. (2004): Genetic study of the forest pest *Tomicus piniperda* (Col., Scolytinae) in Yunnan province (China) compared to Europe: new insights for the systematics and evolution of the genus *Tomicus*. – *Heredity* **93**: 416-422.
- FACCOLI, M., PISCEDDA, A., SALVATO, P., SIMONATO, M., MASUTTI, L. & BATTISTI, A. (2005): Genetic structure and phylogeography of pine shoot beetle populations (*Tomicus destruens* and *T. piniperda*, Coleoptera Scolytidae) in Italy. – *Annual Forest Science* **62**: 361-368.
- FÜHRER, E. (1976): Fortpflanzungsphysiologische Unverträglichkeit beim Kupferstecher (*Pityogenes chalcographus* L.) - Ein neuer Ansatz zur Borkenkäferbekämpfung? – *Forstarchiv* **6**: 114-117.
- GALLEGO, D. & GALIÁN, J. (2001): The internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) of the rDNA differentiates the bark beetle forest pests *Tomicus destruens* and *T. piniperda*. – *Insect. Mol. Biol.* **10**: 415-420.
- HORN, A., ROUX-MORABITO, G., LIEUTIER, F. & KERDELHUÉ, C. (2006): Phylogeographic structure and past history of the circum-Mediterranean species *Tomicus destruens* Woll. (Coleoptera: Scolytinae). – *Mol. Ecol.* **15**: 1603-1615.
- HURST, G.D.D. & JIGGINS, F.M. (2005): Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. – *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **272**: 1525-1534.
- KERDELHUÉ, C., ROUX-MORABITO, G., CHAMBON, J.M., ROBERT, E. & LIEUTIER, F. (2003): Population genetic structure of *Tomicus piniperda* L. (Curculionidae : Scolytinae) on different pine species and validation of *T. destruens* (Woll.). – *Mol. Ecol.* **11**: 483-494.
- KOHLMAYR, B., RIEGLER, M., WEGENSTEINER, R. & STAUFFER, C. (2002): Morphological and genetic identification of the three pine pests of the genus *Tomicus* (Coleoptera, Scolytidae) in Europe. – *Agr. Forest Entomol.* **4**: 151-157.

- SALLÉ, A., ARTHOFER, W., LIEUTIER, F., STAUFFER, C. & KERDELHUÉ, C. (2007): Phylogeography of a host-specific insect: Genetic structure of *Ips typographus* in Europe does not reflect the past fragmentation of its host. – Biol. J. Linn. Soc. **90**: 239-246.
- STAUFFER, C., VAN MEER, M.M.M. & RIEGLER, M. (1997): The presence of *Wolbachia* in European *Ips typographus* (Col., Scolytidae) populations and the consequences for genetic data. – Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent. **11**: 709-711.
- STAUFFER, C., LAKATOS, F. & HEWITT, G.M. (1999): Phylogeography and postglacial colonization routes of *Ips typographus* (Col., Scolytidae). – Mol. Ecol. **8**: 763-774.
- STAUFFER, C., KIRISITS, T., NUSSBAUMER, C., PAVLIN, R. & WINGFIELD, M.J. (2001): Phylogenetic relationships between the European and Asian eight spined larch bark beetle populations (Coleoptera, Scolytidae) inferred from DNA sequence and fungal associates. – Eur. J. Entomol. **98**: 99-105.
- THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. (2006): Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. – Nature **443**: 931-949.
- VEGA, F.E., BENAVIDES, P., STUART, J.A. & O'NEIL, S.L. (2002): *Wolbachia* infection in the Coffee Berry Borer (Coleoptera, Scolytidae). – Ann. Entomol. Soc. Am. **95**: 374-378.
- ZCHORI-FEIN, E., BORAD, C. & HARARI, A.R. (2006): Oogenesis in the date stone beetle, *Coccotrypes dactyliperda*, depends on symbiotic bacteria. – Physiol. Entomol. **31**: 164-169.