

Entomologica Austriaca	15	9-16	Linz, 29.2.2008
------------------------	----	------	-----------------

Molekulare Marker in der Insektengenetik

W. ARTHOFER

Abstract: Molecular markers in insect genetics. Invention of PCR revolutionized the field of molecular biology in the early 1990ies. Since then, a vast amount of genetic marker systems was introduced and led to the formation of the field of molecular ecology. For the phylogeneticist not primary involved in molecular methods it became difficult to decide which of the many marker systems available suit well to a given question. This article describes basic properties of today's most abundantly used molecular markers, discusses the problems recently discovered on the sole use of mitochondrial DNA for phylogenetic purposes and gives a prospect on future developments in the field.

Key words: molecular marker; insect genetics; phylogenetics; mitochondria; microsatellite.

Einleitung

Die Einführung der PCR (Polymerase Chain Reaction; SAIKI et al. 1988) hat seit Anfang der 1990er-Jahre die Möglichkeiten der Molekularbiologie und der genetischen Analyse von Individuen, Populationen und Arten revolutioniert. Mit diesem Verfahren wurde es erstmals möglich, durch Verwendung spezifischer Primer DNA-Abschnitte millionenfach zu amplifizieren und damit eine Zielsequenz aus einer vergleichsweise kleinen Probe für weitere Analysen anzureichern.

Vor der Entwicklung der PCR standen in erster Linie Allozyme (HARRIS 1966; HUBBY & LEWONTIN 1966) sowie die DNA-basierte Technik des Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP; CHAPMAN & BROWN 1989) als molekulare Marker zur Verfügung. Heute existiert eine derartige Vielfalt an Markersystemen und Analysetechniken (SUNNUCKS 2000), dass der – zumeist nicht hauptsächlich in molekularbiologischen Techniken involvierte – Phylogenetiker nur mit Mühe eine Übersicht zu wahren vermag. Der Einsatz unpassender Marker für eine konkrete Fragestellung, aber auch die fehlerhafte Interpretation der Resultate eines an und für sich geeigneten Systems, können Folgen dieses Umstandes sein.

Diese Arbeit stellt einige populäre molekulare Marker in der Entomologie vor und beschreibt Möglichkeiten und Grenzen ihrer Anwendung.

Eigenschaften molekularer Marker

Genetische Marker sind vererbare Merkmale, die verschiedene Ausprägungen annehmen können, beispielsweise Augenfarbe (Merkmal) und blau (Ausprägung). Von molekularen Markern spricht man, wenn das untersuchte Merkmal ein Abschnitt der DNA oder eines ihrer unmittelbaren Folgeprodukte (RNA, Proteine) ist. Von diesem Markermolekül können nun Eigenschaften wie Mobilität in einem Agarosegel, die Wirkung spezifischer Enzyme auf das Molekül oder die exakte Abfolge der Basen (DNA-Sequenz) beobachtet werden. Das Merkmal selbst wird dabei Locus, seine verschiedenen Ausprägungen Allele bezeichnet. Ein diploider Organismus kann folglich pro Locus eine oder zwei verschiedene Merkmalsausprägungen besitzen. Zu beachten ist, dass alle tierischen Organismen neben ihrem diploiden, nuklearen Genom auch ein wesentlich kleineres mitochondriales Genom besitzen, welches haploid ist.

Besonders in der Humanmedizin kommen zahlreiche molekulare Marker zur Anwendung, die den Funktionszustand eines bestimmten Gens anzeigen sollen, etwa bei der Ermittlung eines individuellen Krankheitsrisikos. Solche Marker stehen unter einem starken Selektionsdruck (das pathogene Allel kommt daher in der Gesamtpopulation viel seltener vor als das nicht-pathogene) und können in der Phylogenie nur sehr eingeschränkt benutzt werden. Eine wesentliche Forderung an einen phylogenetischen Marker ist seine Neutralität. Das bedeutet, dass die verschiedenen in einer Population vorhandenen Allele keine Auswirkung auf die Fitness ihres Trägers haben und Mutationen ohne Folge an spätere Generationen weitergegeben werden. Neutrale Marker finden sich typischerweise in der nicht-codierenden DNA, die bis zu 99 % des gesamten Genoms ausmachen kann. Aber auch innerhalb codierender Sequenzen finden sich neutrale Elemente, da Substitutionen einzelner Basen nicht notwendigerweise die Aminosäuresequenz des Genprodukts verändern bzw. auch der Austausch einzelner Aminosäuren ohne Folgen auf die Proteinfunktion bleiben kann (KIMURA 1983). Heute steht eine Reihe statistischer Tests auf Neutralität eines Markers zur Verfügung (RAND 1996).

Molekulare Marker können in single locus- und multi locus-Marker unterteilt werden. Ein single locus Marker bezieht sich auf einen einzigen definierten Bereich der DNA, beispielsweise ein Gen oder einen Mikrosatelliten. Der Ort und die Funktion dieses DNA-Bereichs sind oftmals genau bekannt. Bei der Analyse diploider Organismen werden die Genotypen beider Allele untersucht (Kodominanz). Da für solche Marker spezifische Primer erforderlich sind und für eine zuverlässige phylogenetische Analyse mitunter dutzende loci benötigt werden, ist ihre Entwicklung aufwändig. Dafür liefern sie numerische Daten der Allelverteilung, die mächtige statistische Analysen erlauben und zwischen verschiedenen Studien problemlos verglichen werden können. Im Gegensatz dazu wird bei der Verwendung von multi locus-Markern ein ganzer Satz unbekannter DNA-Abschnitte gleichzeitig in einem Arbeitsgang untersucht. Die Vorteile der multi locus-Marker liegen in der raschen Implementierbarkeit, bei der keine genaue Kenntnis des Genoms erforderlich ist und dem hohen Grad an Polymorphismus, der mit ihnen zumeist darstellbar ist. Andererseits verhalten sich diese Marker dominant (d.h. die Darstellung heterozygoter Allele ist nicht garantiert), und ein substantieller Teil der aufgezeigten Variation kann nicht vererbbarer Natur sein. Daten von multi locus-Markern sind zwischen verschiedenen Studien nur eingeschränkt vergleichbar. Während multi locus-Marker, vor allem bei der Analyse von Nicht-Modell-Arten, nach wie vor breit verwendet werden, ist ein Trend hin zum Einsatz von single locus-Markern erkennbar.

(SUNNUCKS 2000).

Die Häufigkeit von Mutationen innerhalb des Genoms ist sehr unterschiedlich. Zu den konserviertesten Bestandteilen gehören die 18S-rDNA und manche codierende Sequenzen. Wesentlich höher sind die Mutationsraten in nicht translatierten intergenischen Regionen und Introns. Mini- und Mikrosatelliten stellen die dynamischsten Teile des Genoms dar (LEWIN 2004; JARNE & LAGODA 1996). Bei single copy-Markern ist es möglich, von Anfang an einen Locus auszuwählen, dessen Mutationsrate mit dem erwünschten Zeitfenster der zu ermittelnden Phylogenie harmoniert. Während etwa Mikrosatelliten schon nach wenigen Generationen erste Variationen aufzeigen, kaum aber einen Blick über viele Jahrtausende in die Vergangenheit zulassen werden, erlaubt 18S-rDNA die phylogenetische Rekonstruktion von Stammbäumen ganzer Organismenreiche (OLSEN & WOESE 1993), bietet aber andererseits keine Variation zwischen nahe verwandten Taxa.

Multi Locus Marker: RFLP, RAPD und AFLP

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) und Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) werden heute nur noch selten verwendet. Das Prinzip der RFLP basiert auf der Eigenschaft von Restriktionsenzymen, einen DNA-Strang immer dort zu schneiden, wo sich eine für das Enzym spezifische, 4 bis 8 Nukleotide lange Basenfolge, die als recognition site bezeichnet wird, befindet. Stränge mit identischer Sequenz werden daher immer in gleich lange Fragmente geschnitten, die auf einem Agarosegel leicht aufgetrennt werden können. Treten nun Mutationen auf, die zur Bildung neuer oder zum Verschwinden alter recognition sites führen, ändert sich das Schnittmuster und damit die in der Elektrophorese sichtbaren Banden (PARKER et al. 1998). Zur Analyse nuklearer DNA wurde die RFLP häufig mit Hybridisierungstechniken verbunden (SOUTHERN 1975). RAPD arbeitet mit der PCR-Methode und kommt daher mit deutlich weniger Proben-DNA aus als die klassische RFLP. Das DNA-Template wird mit mehreren kurzen Primern amplifiziert, die an zufälligen Stellen im Genom binden. Wo immer Primer nahe genug liegen um eine Amplifikation zu erlauben (typischerweise 100 bis 1000 bp), entsteht ein Produkt, das auf einem Elektrophoresegel als Bande sichtbar gemacht werden kann. In einer einzelnen RAPD-Reaktion können so dutzende Banden gebildet werden (WELSH & MCCLELLAND 1990). Die schlechte Reproduzierbarkeit limitiert den Einsatz dieser Technik.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) stellt eine Kombination von RFLP und RAPD dar. Genomische DNA wird zuerst mit Restriktionsenzymen geschnitten, danach werden Adaptoren an die Fragmente ligiert und schließlich erfolgt eine PCR mit Adaptor-spezifischen Primern (BLEARS et al. 1998). Durch diese Technik konnten die wesentlichen Nachteile der beiden Vorgängermethoden überwunden werden. AFLP ist als multi locus-Marker heute weit verbreitet, auch wenn die Zahl der damit untersuchten Tierarten deutlich hinter jener der Pflanzen zurückbleibt (BENSCH & ÅKESSON 2005).

Mitochondriale DNA

Mitochondrien, die für den Energieumsatz der Zelle verantwortlichen Organellen, sind

aus endosymbiontischen Proteobakterien der ersten eukaryotischen Zellen hervorgegangen (GRAY et al. 2001). Als ehemals selbstständige Mikroorganismen besitzen sie nach wie vor ein eigenes, haploides Genom, das im Laufe der Evolution auf ein zirkuläres Molekül von etwa 15 kb Größe reduziert wurde. Der Großteil der mitochondrialen Genfunktionen wurde von nuklearen Genen übernommen. Das mitochondriale Genom wird strikt maternal vererbt und hat sich über alle Tierarten hinweg fast unverändert erhalten. Es enthält die Gene für zwei ribosomale RNAs, 22 Transfer-RNAs und 13 Proteine. Die mitochondriale DNA (mtDNA) enthält – im Gegensatz zur nuklearen DNA – nur wenige nicht codierende Elemente (LEWIN 2004; RAND et al. 2004). Trotzdem ist die Mutationsrate von mtDNA deutlich höher als die nuklearer Gene, was primär auf das Fehlen effizienter Reparaturmechanismen im Mitochondrium zurückzuführen ist (BROWN et al. 1979).

Die haploide Struktur, die Verfügbarkeit universeller Primer (SIMON et al. 1994) und die hohe Mutationsrate, die eine Auflösung von einigen Millionen Jahren ermöglicht, machten die mtDNA zum bevorzugten Marker der Phylogeographie. Die Analyse von mitochondrialen PCR-Produkten erfolgt vorzugsweise durch Sequenzierung, aber auch Techniken wie PCR-RFLP oder SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism; SUNNUCKS et al. 2000; ARTHOFER et al. 2007a) werden verbreitet angewandt. In den letzten Jahren wurde die alleinige Verwendung von mtDNA zur Rekonstruktion von Stammbäumen zunehmend kritisiert. Verantwortlich dafür waren folgende Überlegungen:

- Aufgrund der Art ihrer Vererbung und der fehlenden Rekombination repräsentiert die mtDNA einen einzigen Locus, der zudem nur die Geschichte der weiblichen Population widerspiegelt.
- Der Transfer mitochondrialer Gene in den Zellkern ist ein immer noch fortlaufender Prozess. Auch wenn die meisten transferierten Sequenzen im Kern als nicht mehr transkribierte Pseudogene vorliegen, können universelle Primer diese mit amplifizieren, was nachweislich zu Artefakten in derart erstellten Stammbäumen führte (BENSASSON et al. 2001).
- Maternal weitergegebene Endosymbionten können die Fekundität und damit die Haplotypen-Frequenz der mtDNA beeinflussen. Der bei Insekten weit verbreitete Endosymbiont *Wolbachia pipientis* hat wesentlichen Einfluss auf die mtDNA-Vielfalt ganzer Populationen (HURST & JIGGINS 2005; RIEGLER & STAUFFER 2002).

Die unbeabsichtigte Amplifikation von Pseudogenen kann durch sorgfältige Untersuchung der Sequenzdaten und long PCR-Techniken zuverlässig nachgewiesen werden (ARTHOFER et al. 2006). Der Ausschluss eines Endosymbionten-Einflusses gestaltet sich schwieriger. Generell muss heute von einer ausschließlichen Verwendung mitochondrialer DNA als Marker abgeraten werden.

Mikrosatelliten

Mikrosatelliten sind kurze DNA-Abschnitte, in denen ein ein bis sechs Nukleotide langes Motiv vielfach wiederholt wird. Sie wurden in allen bisher untersuchten eukaryotischen Genomen gefunden und Motive mit zwei oder drei Nukleotiden scheinen die häufigsten zu sein (ELLEGREN 2004). Von allen DNA-Regionen haben Mikrosatelliten die höchsten Mutationsraten, hauptsächlich durch Erwerb oder Verlust von einzelnen repeat units. Für populationsgenetische Untersuchungen bieten sich Mikrosatelliten als geradezu ideale Marker an, während sie zur Beantwortung systematischer Fragestellungen aufgrund der hohen Mutationsrate nur wenig beitragen können.

Mikrosatelliten werden von konservierten Regionen flankiert, die sich als Bindungsstellen für Primer anbieten. Zur Analyse eines Mikrosatelliten-Locus wird dieser amplifiziert und die Länge des PCR-Produkts direkt mittels Kapillarelektrophorese bestimmt.

Die meisten Mikrosatelliten befinden sich in nicht codierenden Regionen des Genoms. Daher sind auch die flankierenden Regionen einer erheblichen genetischen Drift ausgesetzt und Primer, die über Art- oder gar Gattungsgrenzen anwendbar sind, sind selten. Das macht es erforderlich, bei erstmals untersuchten Spezies geeignete loci de novo zu isolieren. Diese Isolation ist besonders bei Arten mit einer niedrigen Dichte an Mikrosatelliten anspruchsvoll, zeit- und kostenaufwändig. Gerade bei Insekten finden sich mit Coleoptera und Lepidoptera zwei Ordnungen, in denen die Isolation von Mikrosatelliten bei zumindest einigen Arten als problematisch gilt (ARTHOFER et al. 2007b; MEGLE CZ et al. 2004).

Ausblick

Das Feld der molekularen Ökologie und Systematik entwickelt sich rasch und technische Neuerungen können – wie die PCR in den 1990er Jahren – Anwendungen hervorbringen, die heute noch undenkbar scheinen. Trotzdem sind einige Entwicklungen absehbar:

- Die Technik des Sequenzierens wird schneller und billiger. Da die vollständige Gensequenz als der Gold-Standard gelten muss, wird sie alternative Techniken der Mutationsdetektion zunehmend verdrängen.
- Die Zahl der vollständig sequenzierten Genome steigt rasch. Das verbessert nicht nur unser Verständnis der Genomorganisation, sondern ermöglicht auch eine zielgerichtete Markerentwicklung und die Anwendung von Resequenzierungstechniken bei verwandten Arten.
- Die Monopolstellung, die die mitochondriale DNA in den ersten zwei Jahrzehnten der molekularen Ökologie eingenommen hat, wird zunehmend durchbrochen. MtDNA wird auch in künftigen Studien einen festen Platz einnehmen, allerdings immer ergänzt durch eine Reihe nuklearer Marker.
- Die Hoffnung, mit einem oder einigen wenigen Loci zuverlässige Phylogenien oder Fingerprints erstellen zu können, schwindet. Nur die simultane Betrachtung ausreichend vieler Marker erlaubt einen umfassenden Blick auf die Geschichte einer Population.

Zusammenfassung

Die Einführung der PCR hat in den 1990er-Jahren die Molekularbiologie revolutioniert und wesentlich zur Entstehung des Felds der Molekularen Ökologie beigetragen. Systematikern und Phylogenetikern steht heute eine Vielzahl an genetischen Markern zur Verfügung, und die Auswahl des geeignetsten Systems für eine konkrete Fragestellung erweist sich bisweilen als komplexe Aufgabe. In diesem Artikel wurden populäre Marker, die in der Entomologie Verwendung finden, vorgestellt und ihre Möglichkeiten und Grenzen beschrieben. Zudem wurde der Sonderstatus der mitochondrialen DNA in der Phylogenetik kritisch diskutiert und ein abschließender Ausblick auf die künftige Entwicklung der markerunterstützten Populationsgenetik gegeben.

Literatur

- ARTHOFFER W., AVTZIS D.N. & C. STAUFFER (2007a): Fast establishment of single-strand conformation polymorphism by targeted primer development in *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera, Scolytinae). — *Electrophoresis* **28**: 1046-1052.
- ARTHOFFER W., SCHLICK-STEINER B.C., STEINER F.M., AVTZIS D.N., CROZIER R.H. & C. STAUFFER (2007b): Lessons from a beetle and an ant: coping with taxon-dependent differences in microsatellite development success. — *Journal of Molecular Evolution*, doi 10.1007/s00239-007-9012-1.
- ARTHOFFER W., AVTZIS D.N., RIEGLER M., MILLER W. & C. STAUFFER (2006): Pitfalls in Applying Mitochondrial Markers onto the scolytid species *Pityogenes chalcographus*. — In: Bentz & Raffa (eds.) *Proceedings of a Workshop on Bark Beetle Genetics: Current Status of Bark Beetle Genetic Research*. Madison, WI.
- BENSASSON D., ZHANG D.X., HARTL D.L. & G.M. HEWITT (2001): Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. — *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 314-321.
- BENSCH S. & M. ÅKESSON (2005): Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? — *Molecular Ecology* **14**: 2899-2914.
- BLEARS M.J., DE GRANDIS S.A., LEE H. & J.T. TREVORS (1998): Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. — *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **21**: 99-114.
- BROWN W.M., GEORGE M.G. & A.C. WILSON (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**: 1967-1971.
- CHAPMAN R.W. & B.L. BROWN (1989): Two methods to detect DNA fragments produced by restriction enzymes. — *Analytical Biochemistry* **177**: 199-202.
- ELLEGREN H. (2004): Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution. — *Nature Reviews: Genetics* **5**: 435-445.
- GRAY M.W., BURGER G. & B.F. LANG (2001): The origin and early evolution of mitochondria. — *Genome Biology* **2**: 1018.1-1018.5.
- HARRIS H. (1966): Enzyme polymorphism in men. — *Proceedings of the Royal Society of London, B*, **164**: 298-310.
- HUBBY J.L. & R.C. LEWONTIN (1966): A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. — *Genetics* **52**: 203-215.
- HURST G.D.D. & F.M. JIGGINS (2005): Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effect of inherited symbionts. — *Proceedings of the Royal Society of London, B* **272**: 1525-1534.
- JARNE P. & P.J.L. LAGODA (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. — *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 424-429.

- KIMURA M. (1983): The Neutral Theory of Molecular Evolution. — Cambridge University Press, Cambridge.
- LEWIN B. (2004): Genes VIII. — Pearson Education Intl., London.
- MEGLECZ E., PETENIAN F., DANCHIN E., COEUR D'ACIER A., RASPLUS J.Y. & E. FAURE (2004): High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within each of two species of Lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. — *Molecular Ecology* **13**: 1693-1700.
- OLSEN G.J. & C.R. WOESE (1993): Ribosomal RNA: a key to phylogeny. — *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **7**: 113-123.
- PARKER P.G., SNOW A.A., SCHUG M.D., BOOTON G.C. & P.A. FUERST (1998): What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. — *Ecology* **79**: 361-382.
- RAND D.M. (1996): Neutrality Tests of Molecular Markers and the Connection Between DNA Polymorphism, Demography, and Conservation Biology. — *Conservation Biology* **10**: 665-671.
- RAND D.M., HANEY R.A. & A.J. FRY (2004): Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. *Trends in Ecology and Evolution* **19**: 645-653.
- RIEGLER M. & C. STAUFFER (2002): *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). — *Molecular Ecology* **11**: 2425-2434.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. & H.A. ERLICH (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. — *Science* **239**: 487-491.
- SIMON C., FRATI F., BECKENBACH A.T., CRESPI B., LIU H. & P. FLOOK (1994): Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. — *Annals of the Entomological Society of America* **87**: 651-701.
- SOUTHERN E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. — *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-517.
- SUNNUCKS P. (2000): Efficient genetic markers for population biology. — *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 199-203.
- SUNNUCKS P., WILSON A.C.C., BEHEREGARAY L.B., ZENGER K., FRENCH J. & A.C. TAYLOR (2000): SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. — *Molecular Ecology* **9**: 1699-1710.
- WELSH J. & M. MCCLELLAND (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. — *Nucleic Acids Research* **18**: 7213-7218.

Anschrift des Verfassers: DI Dr. Wolfgang ARTHOFER
Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz
Universität für Bodenkultur
Hasenauerstraße 38
1190 Wien, Austria
E-Mail: wolfgang.arthofer@boku.ac.at

DI Dr. Wolfgang Arthofer, Jahrgang 1968, Studium der Landschaftsökologie und Biotechnologie an der Universität für Bodenkultur (Boku) in Wien. Tätigkeit als freier Mitarbeiter im Bereich der Pflanzenbiotechnologie am Forschungszentrum Seibersdorf und als wissenschaftlicher Angestellter des Instituts für angewandte Mikrobiologie in Wien mit Schwerpunkt Viruserkrankungen bei Obstgehölzen. Seit 2003 am Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz der Boku Wien. Gegenwärtige Forschungsschwerpunkte: Untersuchung der Genomdynamik von *Wolbachia* in der Kirschfruchtfliege; Entwicklung von molekularen Markern bei Ameisen und Borkenkäfern.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Entomologica Austriaca](#)

Jahr/Year: 2008

Band/Volume: [0015](#)

Autor(en)/Author(s): Arthofer Wolfgang

Artikel/Article: [Molekulare Marker in der Insektengenetik 9-16](#)