

LJUBLJANA, JUNE 2004

Vol. 12, No. 1: 15–26

XVII. SIEEC, Radenci, 2001

## MOLEKULARBIOLOGIE, FAUNISTIK UND ZOOGEOGRAPHIE

Roland GERSTMEIER und Dieter SEDLMAIR

Technische Universität München, Lehrstuhl für Tierökologie, Am Hochanger 13,  
D-85350 Freising, FRG

### **Abstract** - MOLECULAR BIOLOGY, FAUNISTICS AND ZOOGEOGRAPHY

Following a short description of the faunistics and zoogeography, four molecular biology methods (mtDNA, microsatellites, SSCP, RAPD) and their use in zoogeographical research are presented with examples.

KEY WORDS: molecular biology, faunistics, zoogeography

### **Izveček** – MOLEKULARNA BIOLOGIJA, FAVNISTIKA IN ZOOGEOGRAFIJA

Po kratki razlagi pojmov favnistika in zoogeografija so s primeri predstavljene štiri molekularno biološke metode (mtDNA, mikrosateliti, SSCP, RAPD) in njihova uporaba v zvezi z zoogeografsko problematiko.

KLJUČNE BESEDE: molekularna biologija, favnistika, zoogeografija

### **Definitionen**

Moderne taxonomische, faunistische und zoogeographische Arbeiten beinhalten vielschichtige, interdisziplinäre Ansatzpunkte. Je nach Fragestellung kommen die eingesetzten Methoden somit aus den unterschiedlichsten Wissenschaftsgebieten (u.a. Geographie, Geologie, Klimatologie, Ökologie, Molekularbiologie).

Die **Faunistik** ist eine Arbeitsrichtung der deskriptiven Zoogeographie, die die Erforschung der Tierarten und möglichst auch der subspezifischen Taxa eines bestimmten Gebietes zum Ziel hat und damit eine Grundlage für die Chorologie und weitere Arbeitsrichtungen der Zoogeographie legt (nach SEDLAG & WEINERT 1987). Letztendliches Ziel sollte die vollständige Erfassung des Tierbestandes der Erde sein (De LATTIN 1967). Über Position und Inhalte von "Faunistik" liegen zahlreiche

Äußerungen vor (ASPÖCK 1975, KLAUSNITZER 1997, 2000), in denen z.T. auch über die "Wissenschaftlichkeit" dieses Teilgebietes der Zoologie diskutiert wird. Tatsache ist, daß Faunistik, Taxonomie und Zoogeographie untrennbar miteinander verbunden sind, wobei der Faunistik ausschließlich der deskriptive Teil zugesprochen wird. Direkte molekularbiologische Ansätze gibt es nur in Verbindung mit zoogeographischen Fragestellungen.

Die **Zoogeographie** ist ein Teilgebiet der Biogeographie, das die gegenwärtige und ehemalige Verbreitung der Tiere beschreibt und unter Berücksichtigung ihrer Ausbreitungsmöglichkeiten ursächlich deutet (SEDLAG & WEINERT 1987); sie rekonstruiert zeitliche Abfolgen und räumliche Verläufe von Besiedlungsprozessen, z.B. die postglaziale Besiedelung des nördlichen Europas durch Tiere nach dem Rückgang des Eises (MOSSAKOWSKI 1997). Die Darstellung von Verbreitungsmustern beruht in erster Linie auf einer Synthese von Taxonomie und Faunistik. Eine moderne Forschungsrichtung, die sich mit Prinzipien und Prozessen zur geographischen Verbreitung von Abstammungslinien auseinandersetzt, ist die **Phylogeographie** (AVISE 2000).

## **Molekularbiologische Methoden**

### **Mitochondriale DNA (mtDNA)**

Nach Extraktion der DNA wird diese einer PCR (Polymerase Chain Reaction) zugeführt, die sich in drei Schritte gliedern läßt: Zuerst wird die doppelsträngige DNA-Matrize durch Erhitzen denaturiert; anschließend lagert sich in den flankierenden Bereichen der zu untersuchenden Gen-Sequenz ein entsprechendes Primer-Paar an die Einzelstränge an und startet damit - drittens - die Polymerisation der jeweils komplementären DNA-Stränge mit Hilfe einer DNA-Polymerase. Dieser Zyklus läßt sich vielfach wiederholen und liefert jedesmal eine Verdoppelung der DNA-Fragmente. So erhält man bereits nach 32 Zyklen theoretisch über 1 Milliarde doppelsträngiger Zielmoleküle. Das PCR-Produkt wird, unter Verwendung eines farbstoff-markierten Primers, in die Sequenzier-Reaktion eingesetzt. Die Analyse der Abbruchfragmente erfolgt über ein denaturierendes Polyacrylamidgel, die Bandenmuster werden automatisch ausgewertet und in die Basenabfolge des sequenzierten DNA-Abschnittes umgesetzt. Für die statistische Bearbeitung der Gensequenzen stehen zahlreiche Verfahren (u.a. Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, Neighbour-Joining) zur Verfügung (HILLIS et al. 1996).

### **Mikrosatelliten**

Die Mikrosatelliten-Technik erlaubt den Vergleich einer großen Anzahl von Individuen innerhalb einer Population und findet ihren Einsatz bei populationsgenetischen Fragestellungen. Mikrosatelliten sind Bereiche der genomischen DNA, die eine Aufeinanderfolge von sehr kurzen, jeweils identischen DNA-Abschnitten

darstellen, wobei diese Repeats meist aus nur zwei bis vier Basen bestehen. Die Anzahl solcher Repeat-Wiederholungen variiert von Individuum zu Individuum. Über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese kann die Anzahl dieser Wiederholungen, die ein Individuum besitzt (auf beiden Allelen) analysiert werden (HILLIS et al. 1996).

### SSCP-Analyse

Die SSCP (Single-strand conformation polymorphism) Elektrophorese wird seit einigen Jahren zur Detektion von Sequenzunterschieden innerhalb von Genen angewendet (BOGE et al. 1994). Die zuvor über PCR amplifizierte DNA-Abschnitte werden durch Hitze denaturiert und in eine native Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese eingesetzt. Die einzelsträngigen Fragmente bilden aufgrund intramolekularer Wechselwirkungen eine dreidimensionale Struktur aus, die von der jeweiligen Basensequenz bestimmt wird. Bei Sequenzunterschieden ergeben sich unterschiedliche Konformationen der zu analysierenden DNA-Abschnitte, woraus wiederum unterschiedliche Laufeigenschaften im Gel resultieren. Letztendlich erhält man ein spezifisches Bandenmuster, welches vorhandene Mutationen aufzeigt.

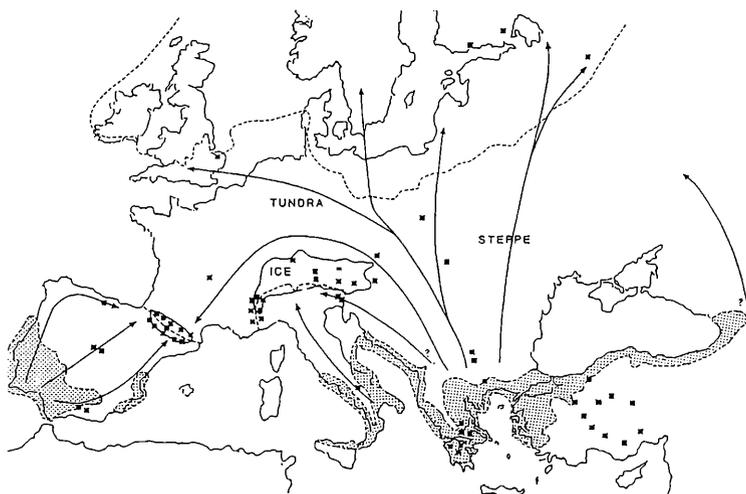
### RAPD-PCR

Bei der RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) wird ein Zufallsprimer (in der Regel mit einer Länge von 10 Basen) eingesetzt, wobei die gesamte DNA als Matrize dient (HADRYN et al. 1992). Bei geringer Stringenz (sehr niedrige Annealing-Temperatur) zeigen die Primer die Tendenz, sich relativ unspezifisch an mehreren Stellen der genomischen DNA anzulagern. Die Abschnitte solcher Primer-Bindungsstellen können letztendlich amplifiziert werden. Die Analyse der PCR-Produkte im Agarosegel resultiert in unterschiedlichen Bandenmustern pro RAPD-Primer und oftmals pro Individuum. Über Bandsharing-Index und mittels UPGMA-Analyse (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) werden die Ähnlichkeiten der gefundenen Bandenmuster zueinander ausgewertet.

### Beispiele

#### mtDNA

Der Gemeine Grashüpfer (*Chorthippus parallelus*) ist über ganz Europa bis nach Sibirien verbreitet und dient seit über 10 Jahren als Studienobjekt, insbesondere hinsichtlich einer Hybridzone in den Pyrenäen (RITCHIE et al. 1989). Die Verbreitung vieler Arten ist durch enge Hybridzonen unterteilt, innerhalb derer zwei divergierende Genpools aufeinandertreffen, die ihren Ursprung in verschiedenen Glazialrefugien hatten. (Abb. 1; HEWITT 1996). Vergleicht man die DNA solcher Populationen, so kann man feststellen, von welchem Refugium aus sich besondere



**Abb. 1:** Mögliche Expansionsrouten von *Chorthippus parallelus*, ausgehend von vermutlichen Eiszeitrefugien, abgeleitet von DNA-Sequenzdaten (aus HEWITT 1996).

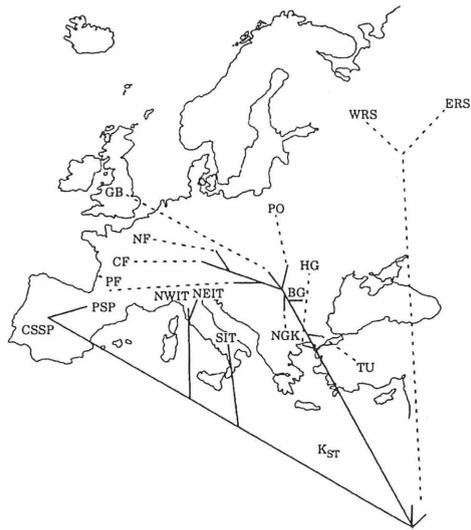
Genpools entwickelt haben, um ihre heutige Verbreitung einzunehmen. In der gegenwärtigen (klassischen) Taxonomie werden drei Unterarten von *Chorthippus parallelus* auf der iberischen Halbinsel, in Griechenland und im restlichen Europa unterschieden.

Die DNA-Sequenzierung von etwa 350 Individuen aus 88 Populationen ergab, daß der Genpool von *C. parallelus* in mindestens fünf geographischen Hauptregionen aufgeteilt ist (Abb. 2; HEWITT 1999). Die nordeuropäischen Haplotypen zeigen dabei eine geringe Diversität und ähneln denjenigen auf dem Balkan, so daß eine post-glaziale Expansion ausgehend von einem Balkan-Refugium angenommen werden muß. Die Türkei, Griechenland, Italien und Spanien beinhalten jeweils einen großen Anteil einzigartiger Haplotypen, die evt. einen subspezifischen Status rechtfertigen würden. Folgende Rückschlüsse lassen sich hinsichtlich der Eiszeitgeschichte ziehen:

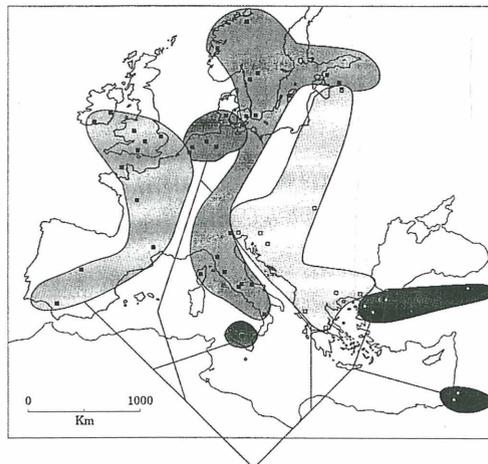
Die Hybridzone in den Pyrenäen wurde durch eine Besiedelung von einem südspanischen Refugium aus und einer Expansion aus dem Balkan, mit Ausbreitung über Europa bis hin zur Kolonisierung der französischen Pyrenäenseite, geformt.

Italien wurde von einem Refugium in Kalabrien ausgehend besiedelt; konsequenterweise muß eine Hybridzone in den Alpen existieren, was tatsächlich auch bewiesen werden konnte (FLANAGAN et al. 1999).

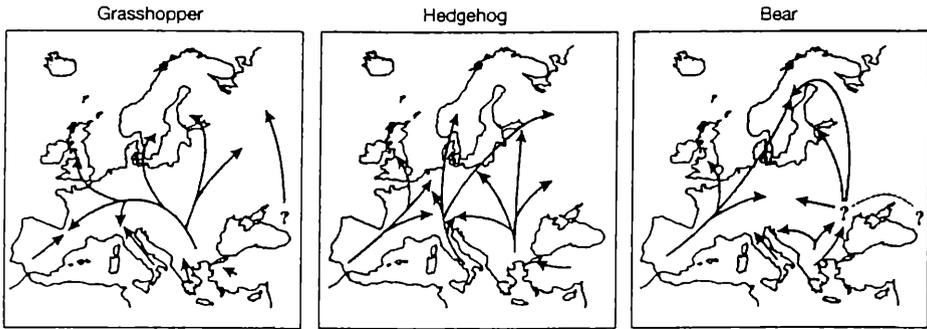
Im Süden besteht eine größere genetische Variation als im nördlichen Bereich.



**Abb. 2:** Genomverteilung von *Chorthippus parallelus* in geographischen Hauptregionen. CSSP = Zentral- und Südspanien, PSP = Spanische Pyrenäen, NWIT = Nordwest-Italien, NEIT = Nordost-Italien, IST = Süd-Italien, WRS = West-Russland, ERS = Ost-Russland, TU = Türkei, NGK = Nord-Griechenland, BG = Bulgarien, HG = Ungarn, PO = Polen, GB = Großbritannien, NF = Nord-Frankreich, CF = Zentral-Frankreich, PF = Französische Pyrenäen (aus HEWITT 1999).



**Abb. 3:** Phylogeographie der mtDNA-Haplotypen der europäischen Igelarten (Westigel, *Erinaceus europaeus*; Ostigel, *Erinaceus concolor*), basierend auf einem Neighbour-Joining-Dendrogramm (aus HEWITT 1999).



**Abb. 4:** Drei Musterbeispiele zur nacheiszeitlichen Kolonisierung Europas anhand von Unterschieden in der mtDNA (aus HEWITT 2000).

Die nacheiszeitliche Besiedelung Europas, ausgehend von süd- und südosteuropäischen Refugien, kann in ähnlicher Weise auch an anderen Tiergruppen (und Pflanzen) gezeigt werden. Die beiden parapatrischen Igelarten, West- und Ostigel (*Erinaceus europaeus*, *E. concolor*), stoßen in einer breiten Überlappungszone, die vom Baltikum bis zur Adria reicht, zusammen. Untersuchungen der mtDNA (Cytochrome b; SANTUCCI et al. 1998) ergaben eine klare Trennung der beiden Arten sowie eine Aufteilung in vier Haupt-Haplotypen; die iberischen Haplotypen unterscheiden sich von denjenigen Deutschlands und Italiens, die Balkan-Haplotypen sind klar von denjenigen der Türkei und Israels getrennt (Abb. 3; HEWITT 1999). Die Igel-Phylogeographie zeigt somit eine von *Chorthippus parallelus* deutlich unterschiedliche postglaziale Ausdehnung. Pyrenäen und Alpen wirkten hier nicht als Ausbreitungsbarrieren, die Besiedelung Mittel- und Nordeuropas erfolgte von drei Hauptrefugien aus und die Türkei und der Nahe Osten bildeten ein weiteres Refugium (Abb. 4; HEWITT 2000).

Beim Braunbären (*Ursus arctos*) ergeben sich getrennte westliche und östliche Linien; die Besiedelung Europas erfolgte von einem spanischen und einem kaukasisch/karpathischen Refugium aus. In Mittelschweden hat sich eine Hybridzone herausgebildet; die Verzweigungen Italiens und des Balkans dehnten sich nicht weiter nördlich aus (Abb. 4). Unklar ist, von wo aus die östliche Expansion ausstrahlte und wie weit die Ausdehnung nach Westen voranschritt (KOHN et al. 1995, TABERLET et al. 1995).

### Mikrosatelliten

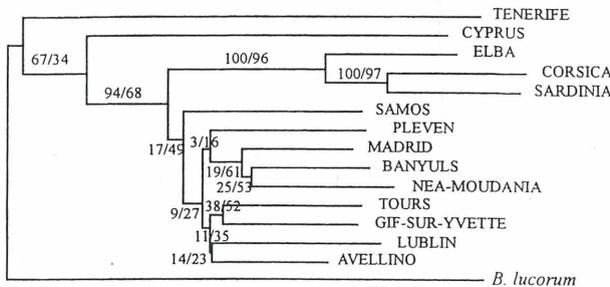
Zu Beginn der 90er Jahre stießen molekularbiologische Untersuchungen von Hautflüglern noch auf Schwierigkeiten, da Allozyme-Studien keine genetischen Unterschiede zwischen Populationen zeigten. Ein Autorenteam um den Franzosen Arnaud ESTOUP setzte demzufolge Mikrosatelliten zur populationsgenetischen Untersuchung der Dunklen Erdhummel (*Bombus terrestris*) ein. Die natürliche



**Abb. 5:** Sammelstellen und taxonomischer Status von *Bombus terrestris*-Populationen. Mitteleuropa: subsp. *terrestris*; Südwesteuropa: subsp. *ferrugineus*; Tenerifa: *B. canariensis*; Korsika: subsp. *xanthopus*; Sardinien: subsp. *sassaricus*; Elba: subsp. *terrestris*; Italien: subsp. *calabricus*; Bulgarien, Griechenland, Samos, Zypern: subsp. *dalmatinus* (aus ESTOUP et al. 1996).

Verbreitung dieser Erdhummel erstreckt sich über das kontinentale Europa, östlich bis zum Kaukasus und Ural; auch auf allen größeren mediterranen Inseln ist dieser wichtige Bestäuber zu finden (Abb. 5; ESTOUP et al. 1996).

Das Neighbour-Joining-Dendrogramm zeigt die Verwandtschaft der 8 kontinentalen und der 5 Insel-Populationen (Abb. 6; ESTOUP et al. 1996); als Außengruppen dienten die Helle Erdhummel (*B. lucorum*) und die Kanarische Hummel (*B. canariensis*). Zwischen den kontinentalen Populationen gibt es keine signifikanten Unterschiede; dies stimmt mit früheren Allozyme-Studien überein (SCHOLL et al. 1990). Die geringe genetische Variabilität liegt höchstwahrscheinlich an ausgedehnten Frühjahrswanderungen der Königinnen, über mehrere Kilometer Entfernung von ihrem Geburtsort. Die Inselpopulationen zeigen dagegen deutlichere Unterschiede; so ergeben sich drei klare Verzweigungen, die Tenerifa, Zypern und die tyrrhenischen Inseln betreffen.



**Abb. 6:** Neighbour-Joining-Dendrogramm der 8 kontinentalen und 5 Insel-Populationen von *Bombus terrestris*, mit *B. canariensis* und *B. lucorum* als Außengruppen (aus ESTOUP et al. 1996).

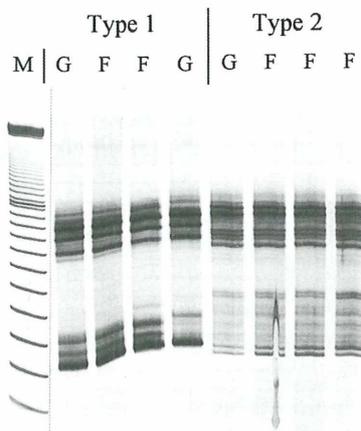
Die Mikrosatelliten-Technik zeigt zwar deutliche Unterschiede zwischen Populationen, läßt aber aufgrund der schnellen Evolutionsrate der analysierten DNA-Abschnitte keine zoogeographischen Aussagen zu.

### Ubiquitin-SSCP-Analyse

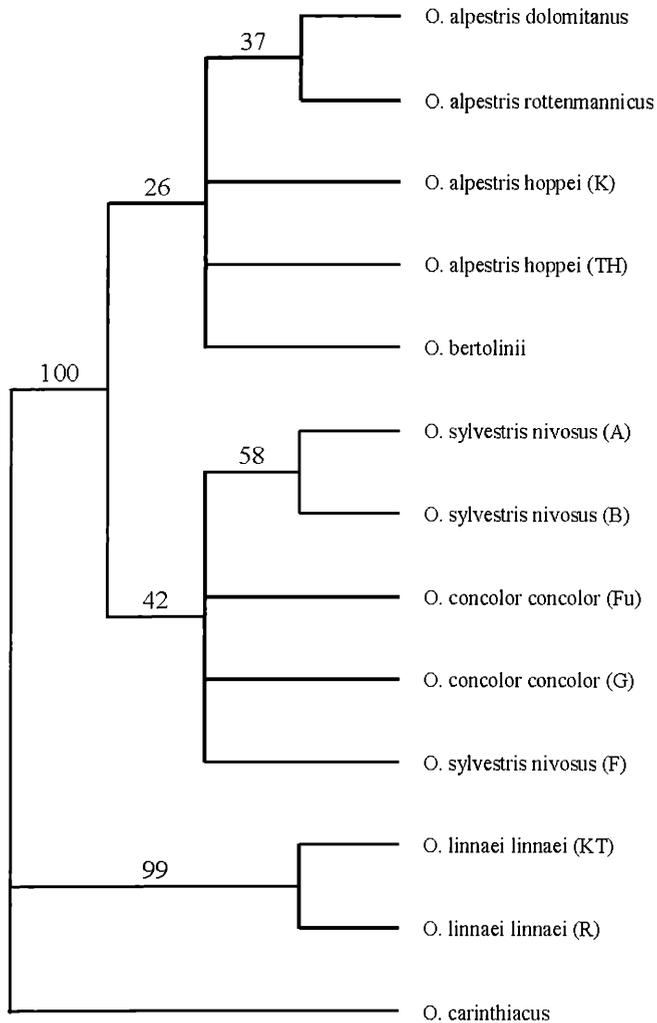
Die Taxonomie innerhalb der bekannten Laufkäfer-Gattung *Carabus* ist durch eine Vielzahl subgenerischer und subspezifischer Klassifikationen erschwert; zahlreiche Arten, Unterarten, Mikrorassen und Hybride wurden beschrieben. Die Untergattung *Orinocarabus* zeigt in den europäischen Alpen eine disjunkte Verbreitung. Eine erste Untersuchung basierend auf der Analyse des Ubiquitin-Gens mittels SSCP-Elektrophorese resultierte in unterschiedlichen Bandenmustern der 14 untersuchten Populationen (SEDLMAIR et al. 1997). Gravierende Unterschiede ergaben sich bei der Analyse von zwei Populationen der Art *O. concolor*, deren Individuen vom Grimsel- und vom Furkapaß aus der Schweiz stammten. Die beiden typischen Bandenmuster treten gemischt an **beiden** Fundorten auf (Abb. 7; SELDMAIR et al. 2000).

Die Sequenzierung eines mitochondrialen Genabschnittes (SEDLMAIR et al. 2000) ergab Unterschiede zwischen der Grimsel- und der Furkapaß-Population; innerhalb dieser Populationen waren dagegen keine Unterschiede erkennbar (Abb. 8; SELDMAIR et al. 2000). Offensichtlich spiegeln die Ubiquitin-SSCP-Banden als kernkodierte Gene den gemeinsamen Ursprung der beiden Populationen wider, während die mitochondrialen Sequenzdaten der geographischen Isolierung der beiden Fundorte entsprechen.

Anders ausgedrückt: Die Genpools der beiden *concolor*-Populationen haben sich schon vor langer Zeit getrennt, wobei die Ubiquitin-Genotypen aber erhalten



**Abb. 7:** Die beiden unterschiedlichen Ubiquitin-SSCP-Typen von *Orinocarabus concolor concolor*; F = Individuen vom Furkapaß, G = Individuen vom Grimsel- und vom Furkapaß, M = Marker, 100 BP (aus SELDMAIR et al. 2000).



**Abb. 8:** Maximum Likelihood Dendrogram eines mtDNA-Abschnittes von ND1 mitteleuropäischer *Orinocarabus*-Arten (aus SEDLMAIR et al. 2000).

blieben. Die nacheiszeitliche Entwicklung hat dann aber zu einer divergierenden Evolution der mitochondrialen Gene führt, so daß man anhand der mtDNA heute problemlos Grimselpaß- und Furkapaß-Population differenzieren kann.

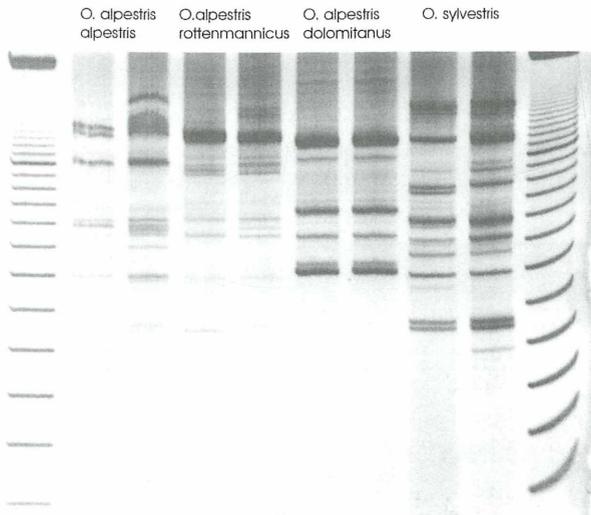
### RAPD-PCR

Hat man die richtigen Zufallsprimer gefunden, ist die RAPD-PCR eine einfache und schnelle Methode, um Populationen zu unterscheiden. Vergleicht man drei Unterarten von *Orinocarabus alpestris* mit *O. sylvestris*, so zeigen die Bandenmuster eine gute Differenzierung der drei *alpestris*-Unterarten und eine deutliche Trennung zu *O. sylvestris* (Abb. 9; GERSTMEIER et al. 1998).

Wertet man die Bandenübereinstimmung anhand des Bandsharing-Index aus (Tab. 1), ergibt sich eine hohe prozentuale Übereinstimmung zwischen den Individuen der einzelnen Unterarten von *O. alpestris* (75-91%), eine mittlere Übereinstimmung zwischen den Unterarten (29-32%) und einen geringen Prozentsatz beim Vergleich zur Art *O. sylvestris* (17%).

**Tab. 1:** Bandsharing Index der RAPD-PCR, basierend auf Abb. 9.

	O.a. alpestris	O.a. rottenmannicus	O.a. dolomitanus	O. sylvestris
O.a. alpestris	75%	/	/	17%
O.a. rottenmannicus	31%	86%	/	/
O.a. dolomitanus	29%	32%	91%	/



**Abb. 9:** RAPD-PCR Bandenmuster der drei Unterarten von *Orinocarabus alpestris* und *O. sylvestris* (aus GERSTMEIER et al. 1998).

## Literatur

- Aspöck, H.**, 1975: Taxonomie und Faunistik der Stechmücken von der Medizinischen Entomologie kritisch beleuchtet. Verh. VI. SIEEC Lunz 1974, 251-262.
- Avise, J.C.**, 2000: Phylogeography. The History and Formation of Species. - Harvard University Press, Cambridge/Massachusetts.
- Boge, A., Gerstmeier, R., Einspanier, R.**, 1994: Molecular Polymorphism as a tool for differentiating ground beetles (*Carabus* species): application of ubiquitin PCR/SSCP analysis. - *Insect Molecular Biology* 3 (4), 267-271.
- De Lattin, G.** 1967: Grundriss der Zoogeographie. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J.-M., Goudet, J., Scholl, A.**, 1996: Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. - *Molecular Ecology* 5, 19-31.
- Flanagan, N.S., Mason, P.L., Gosalvez, J., Hewitt, G.M.**, 1999: Chromosomal differentiation through an Alpine hybrid zone in the grasshopper *Chorthippus parallelus*. - *Journal of Evolutionary Biology* 12, 577-585.
- Gerstmeier, R., vom Hofe, H., Sedlmair, D., Einspanier, R.**, 1998: Populationsökologische und -genetische Untersuchungen an Laufkäfern (Coleoptera, Carabidae). - *Laufener Seminarbeiträge* 2/98, 31-37
- Hadrys, H., Balcik, M., Schierwater, B.**, 1992: Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. - *Molecular Ecology* 1, 55-63.
- Hewitt, G.M.**, 1996: Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. - *Biological Journal of the Linnean Society* 58, 247-276.
- Hewitt, G.M.**, 1999: Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68, 87-112.
- Hewitt, G.M.**, 2000: The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907-913.
- Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K.**, 1996: Molecular Systematics. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Klausnitzer, B.**, 1997: Faunistik heute allgemein, angewandt, abgewandt. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* 11, 829-837.
- Klausnitzer, B.**, 2000: Entomofaunistik an der Schwelle zum 3. Jahrtausend. *Entomologica Basiliensia* 22, 61-74.
- Kohn, M., Knauer, F., Stoffella, A., Schröder, W., Pääbo, S.**, 1995: Conservation genetics of the European brown bear - a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. - *Molecular Ecology* 4, 95-103.
- Mossakowski, D.**, 1997: Klassische und molekulare Methoden. Ihre Rolle in der

- modernen Evolutionsbiologie. Edition Archaea, Gelsenkirchen/Veröffentlichungen aus dem Übersee-Museum Bremen 13, 31-46.
- Ritchie, M.G., Butlin, R.K., Hewitt, G.M.**, 1989: Assortive mating across a hybrid zone in *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae). - *Journal of Evolutionary Biology* 2, 339-352.
- Santucci, F., Emerson, B.C., Hewitt, G.M.**, 1998: Mitochondrial DNA phylogeography of European hedgehogs. - *Molecular Ecology* 7, 1163-1172.
- Scholl, A., Obrecht, E., Owen, R.E.**, 1990: The genetic relationship between *Bombus moderatus* Cresson and the *Bombus lucorum* auct. species complex (Hymenoptera: Apidae). - *Canadian Journal of Zoology* 68, 2264-2268.
- Sedlag, U., Weinert, E.**, 1987: Biogeographie, Artbildung, Evolution. Wörterbücher der Biologie. - UTB Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Sedlmair, D., Gerstmeier, R., Einspanier, R.**, 1997: Molekulargenetische Techniken zur Differenzierung mitteleuropäischer *Orinocarabus*-Arten (Coleoptera, Carabidae). - *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* 11, 821-824
- Sedlmair, D., Gerstmeier, R., Einspanier, R.**, 2000: Application of ubiquitin SSCP analysis in taxonomic studies within the subgenus *Orinocarabus* (Coleoptera: Carabidae: *Carabus*). - *European Journal of Entomology* 97, 387-394
- Taberlet, P., Swenson, J.E., Sandegren, F., Bjärvall, A.**, 1995: Localization of a contact zone between two highly divergent mitochondrial DNA lineages of the brown bear (*Ursus arctos*) in Scandinavia. - *Conservation Biology* 9, 1255-1261.