

**Einsatz molekularer Marker zur Analyse der genetischen Diversität unterschiedlicher Populationen der Blutlauszehrwespe, *Aphelinus mali* (Haldeman) (Hymenoptera: Aphelinidae)**

<sup>1</sup>Nadine A. Gund, <sup>1,2</sup>Annette Reineke, <sup>1</sup>Inge Matthies, <sup>1</sup>Jutta Kienzle & <sup>1</sup>Claus P. W. Zebitz

<sup>1</sup>Universität Hohenheim, Institut für Phytomedizin, Stuttgart  
<sup>1,2</sup>Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Entomologie

**Abstract:** The endoparasitoid *Aphelinus mali* (HALDEMAN) (Hymenoptera: Aphelinidae) has been introduced from its native home North America to Europe in 1920 as a biological control agent for the woolly apple aphid *Eriosoma lanigerum* (HAUSMANN). When *A. mali* appears early in spring with the temperatures being relatively low at this time, the rate of parasitism and consequently the effectivity of the parasite is quite low. Thus, an identification and a subsequent release of *A. mali* biotypes which might be better adapted to the prevailing environmental conditions could result in higher parasitisation rates by this parasitoid.

As a first step towards the identification of *A. mali* biotypes we examined the extent of genetic diversity in *A. mali* field populations and in individuals from a laboratory rearing *A. mali* was collected from different regions such as Germany (BBA Dossenheim, Lake Constance, Altes Land, Stuttgart-Mühlhausen, Ahrweiler), Canada, France, Italy and the Netherlands and genomic DNA was analysed using the AFLP-Technique (Amplified Fragment Length Polymorphism) as well as amplification and sequence analysis of the ITS-2 (Internally Transcribed Spacer) region.

**Key Words:** *Aphelinus mali*, population genetics, ITS2, AFLPs.

<sup>1</sup>N.A. Gund, Dr. I. Matthies, J. Kienzle & Prof. Dr. C.P.W. Zebitz, Universität Hohenheim, Institut für Phytomedizin, D-70593 Stuttgart, e-mail: gundnadi@uni-hohenheim.de; zebitz@uni-hohenheim.de

<sup>1,2</sup> Dr. A. Reineke, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Entomologie, D-07745 Jena, e-mail: areineke@ice.mpg.de

Die Blutlaus *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) wurde Ende des 18. Jahrhunderts nach Europa eingeschleppt. *E. lanigerum* ist ein Schädling des Apfels, wobei es durch die Saugtätigkeit der Aphiden zu Wuchshemmungen (Blutlauskrebs, Blutlausgallen) infolge von Stoffwechselstörungen, zu irreversiblen Trieb- und Knospenschäden bis hin zum Absterben des Baumes kommen kann.

Durch ihre versteckte Lebensweise unter den Rindenschuppen des Baumes sowie auf Grund von flüssigkeitsabweisenden Wachsausscheidungen sind die Tiere sehr gut gegen chemische Bekämpfungsmaßnahmen geschützt. Alternativ kann eine biologische Bekämpfung über den natürlichen Gegenspieler der Blutlaus, die Blutlauszehrwespe *Aphelinus mali* (HALDEN), erfolgen. Zwar kann sich diese Zehrwespe in wärmeren Gebieten sehr gut vermehren, bei niedrigen Frühjahrstemperaturen kann die Populationsdichte aber stark minimiert werden oder ganz einbrechen. Auch feuchte Witterung wird von *A. mali* nicht gut vertragen und schmälert die Parasitierungsraten. Die Blutlauszehrwespe hat einen Entwicklungsnullpunkt bei 8,3 bis 9,0°C, während die Blutlaus erst bei ca. 5°C ihre Entwicklung einstellt. Damit ergibt sich die Frage, ob es Biotypen dieser Schlupfwespe gibt, die möglicherweise besser an die vor Ort herrschenden Klimabedingungen angepasst sind. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, das Ausmaß der genetischen Diversität zwischen einzelnen Populationen zu erfassen und somit Aussagen über eventuell auftretende Biotypen der Wespe treffen zu können.

### Material und Methoden

Die Blutlauszehrwespen wurden entweder nach dem Schlupf gesammelt und sofort bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder nach dem Schlupf in Ethanol konserviert.

Die genomische DNA der Tiere aus unterschiedlichen Freilandpopulationen (Europa und Kanada) sowie aus einer Laborzucht (BBA Dossenheim) wurde nach einem CTAB-Protokoll extrahiert (REINEKE et al. 1998) und die genetische Diversität anhand von zwei unterschiedlichen molekularen Methoden untersucht.

Zum einen wurde die ITS2-Region (Internally Transcribed Spacer) mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) amplifiziert und anschließend sequenziert. Hierzu wurde nach der PCR mit ITS2-spezifischen Primern  $5\ \mu\text{l}$  des PCR-Ansatzes abgenommen und das Vorhandensein eines ca. 550-600 bp großen PCR-Produktes auf einem Agarosegel getestet. Der Rest der PCR-Reaktion wurde mit dem Qiaquick® PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und von der Firma GATC (Konstanz) sequenziert. Ein Alignment der erhaltenen Sequenzen wurde mit der Software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) erstellt.

Als weitere Methode wurde eine AFLP-Analyse (Amplified Fragment Length Polymorphism) durchgeführt. Diese Technik beruht auf selektiver Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, die nach Verdau mit zwei Restriktionsenzymen entstehen (VOS et al. 1995). Hierzu wurden vier verschiedene fluoreszenzmarkierte Primerkombinationen (E-ACC/M-CCA; E-ACC/M-AGA; E-ACC/M-AGG und E-ACC/M-TCC) eingesetzt. Die Banden wurden auf einem automatischen Sequenzierer (ALFExpress II, Amersham, Freiburg) detektiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GelComparII™, Version 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgien). Eine statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm AFLP-surv. Die anhand der erhaltenen AFLP-Banden ermittelten genetischen Distanzen zwischen den Proben wurden graphisch in Form von Dendrogrammen dargestellt.

### Ergebnisse und Diskussion

Mittels genspezifischer Primer wurde ein 444 bp großes Stück der ITS2-Region amplifiziert (GenBank accession no. AY941827). Eine Sequenzierung der PCR-Produkte ergab keine Unterschiede zwischen den *A. mali* Individuen aus neun verschiedenen Populationen (Kanada, Niederlande, Frankreich, Italien, Deutschland: Ahrweiler, Altes Land, BBA Dossenheim, Bodensee, Stuttgart-Mühlhausen). Die ITS2-Sequenz von *Aphelinus albipodus* (GenBank acc. no. AY603666) wurde als „outgroup“ für die Analysen verwendet (Abb.1).

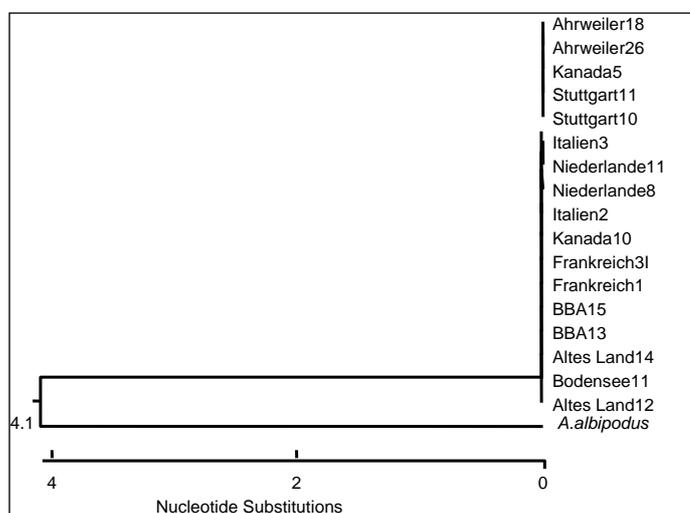


Abb.1: Clusteranalyse auf Basis der Sequenzen der ITS2-Region.

Die Analyse von *A. mali*-Tieren aus sechs verschiedenen Populationen (Kanada, Niederlande, Deutschland: Altes Land, BBA, Bodensee, Stuttgart-Mühlhausen) mit vier verschiedenen AFLP-Primerkombinationen resultierte in der Detektion von insgesamt 123 AFLP-Fragmenten, von denen 101 polymorph waren. Dies entspricht 82,1% der Fragmente. Eine statistische Auswertung der AFLP-Daten

ergab eine gesamte genetische Diversität ( $H_t$ ) von 0.3828, eine durchschnittliche genetische Diversität innerhalb der Populationen ( $H_w$ ) von 0.3545, sowie eine durchschnittliche genetische Diversität zwischen den Populationen ( $H_b$ ) von 0.0284. Die niedrigste Diversität innerhalb der Tiere einer Population wurde zwischen den Individuen aus einer Laborzucht (BBA,  $H_w = 0.28957$ ) detektiert, und deutet damit auf eine gewisse „genetische Verarmung“ von Wespen aus Laborzuchten hin. Der Wright'sche Fixierungsindex  $F_{st}$  (0,0793,  $P < 0,001$ ) ließ auf eine signifikante genetische Differenzierung der untersuchten *A. mali* Populationen schließen. Diese Tendenz wurde auch in einem Dendrogramm auf Grundlage der AFLP-Daten sichtbar, bei dem einige Tiere entsprechend ihrer geographischen Herkunft zusammen clustern (Abb. 2).

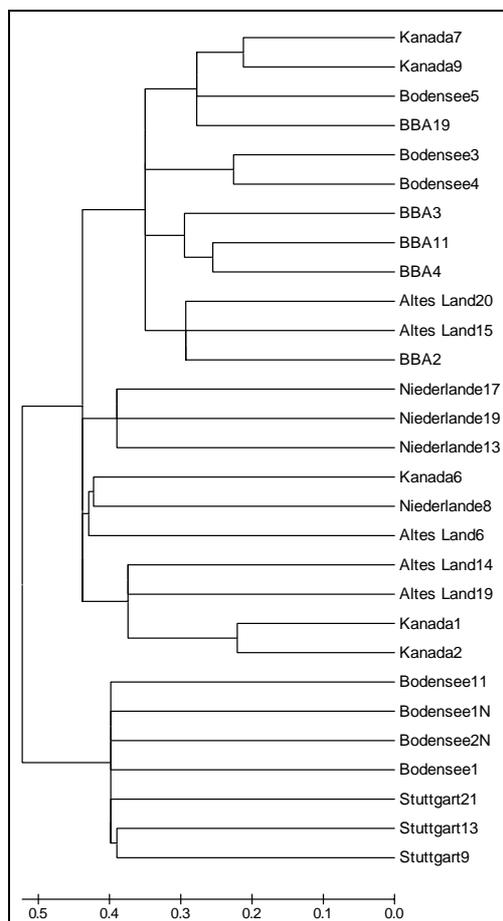


Abb. 2: Neighbor-Joining-Tree mit *A. mali*-Tieren aus sechs verschiedenen Populationen auf Grundlage von 123 AFLP-Fragmenten, die mit vier verschiedenen Primerkombinationen erzeugt wurden. Die Skala gibt das Ausmaß an genetischer Distanz an.

Während die Analyse der ITS2-Region nicht geeignet zu sein scheint, um genetische Diversität zwischen *A. mali* Tieren aus unterschiedlichen Populationen aufzudecken, ließ der Einsatz von AFLP-Markern auf eine hohe genetische Variabilität der Tiere schließen. Damit existieren möglicherweise auch Biotypen dieser Wespe. Inwieweit sie sich hinsichtlich ihrer Thermotoleranz unterscheiden, ist Bestandteil zukünftiger Untersuchungen.

#### Literatur

REINEKE, A., KARLOVSKY, P. & ZEBITZ, C.P.W. (1998): Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. – *Insect Mol. Biol.* 7 (1): 95-99.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. & ZABEAU, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – *Nucleic Acids Res.* 23 (21): 4407-4414.