

**Mitochondrial and Nuclear Markers for Analyzing the  
Phylogeography of *Pityogenes chalcographus*  
(Coleoptera, Scolytidae):  
Development, Applications and Pitfalls**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. nat. techn.

ausgeführt am Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz,  
Department für Wald- und Bodenwissenschaften

eingereicht an der Universität für Bodenkultur Wien

von

**Dipl.-Ing. Wolfgang Arthofer**

Erstgutachter: Ao. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Christian Stauffer

Zweitgutachter: Ao. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Florian Rüker

Wien, November 2005

**Abstract**

*Pityogenes chalcographus* is one of the major pests in Eurasian spruce stands and, besides others, the beetle's ability to aggregate facilitates periodical mass outbreaks. Crossing experiments performed in the mid 1970ies showed differences in reproductive compatibility when insects from various geographic origins were mated. Furthermore, morphological differences between European populations were observed. A race differentiation due to past separation events during Quarternary glaciations was hypothesized.

Today genetic markers offer a possibility to reconstruct the history of taxa in time and space by analyzing changes in the insects DNA sequence. In this thesis molecular tools for phylogenetic investigations on *P. chalcographus* are presented and compared.

Mitochondrial DNA was among the first markers to be introduced in phylogenetic studies. The availability of cross-species amplifying universal primers and its comparable high mutation rate made mtDNA an ideal molecule to investigate population genetic events ranging back several myr. MtDNA analysis of *P. chalcographus* gave evidence that today's populations are divided into several clades. The genetic distance between clades suggests an allopatric origin with a separation about one myr ago while today haplotypes of the major clades coexist sympatrically all over Europe. Based on the detected mutational sites specific single strand conformation polymorphisms (SSCP) were developed in frame of this thesis. The suitability of the SSCP system for fast genotyping was tested and proved positive for distinguishing the main clades.

Within the last years the use of mtDNA as a sole genetic marker became matter of critical discussion. It was shown that nuclear copies of mtDNA (numts) led to artefacts in some of the derived genealogies. To validate the dataset of *P. chalcographus* a long PCR based approach for elimination of potential numt sequences was developed. Comparison of direct and long PCR derived phylogenies

showed that the beetle's genome does not contain amplifiable nuclear copies of the mitochondrial target gene.

Another factor that may influence mitogenomes is the presence of endosymbiotic *Wolbachia*, causing alterations in insect reproduction and thus influencing the populations mtDNA patterns. While *Wolbachia* was not found in *P. chalcographus* in past studies, the use of long and nested PCR, cloning and sequencing of PCR products and *in situ* hybridization techniques gave evidence that at least a certain percentage of European populations harbour the endosymbiont. An influence on the mitochondrial dataset can not be excluded and further research is suggested to estimate the prevalence of *Wolbachia* in *P. chalcographus*.

Nuclear markers are a possibility to overcome the limitations of mtDNA. Investigations on the applicability of these marker systems, with a focus on microsatellite sequences, were performed. Microsatellites are short tandem repeats made up of 1-6 nucleotide motifs. Proprietary mutational mechanisms cause high substitution rate and polymorphism at such loci. Locus specific primers must be developed *de novo* for each species to be analyzed for the first time. Different methods for microsatellite isolation were compared and seven polymorphic loci identified by use of a library enrichment strategy. Compared to many other insect species, microsatellites in *P. chalcographus* seem to be less abundant, shorter and less polymorphic.

As an alternative approach towards a nuclear marker system the isolation of transposable genetic elements by degenerate primed PCR was investigated. Three sequences with homology to known transposons were identified and may serve as a starting point for subsequent marker development.

## Kurzfassung

Der Kupferstecher *Pityogenes chalcographus* gehört zu den wichtigsten Schädlingen in eurasischen Fichtenstandorten. Seine Fähigkeit zur Aggregation führt neben anderen Schadfaktoren zu regelmäßig wiederkehrenden Massenausbrüchen. Versuche in der 1970er Jahren zeigten Unterschiede in der Kreuzungskompatibilität von Käfern verschiedener Herkünfte. Weiters wurden morphologische Unterschiede zwischen diversen europäischen Populationen festgestellt. Diese Befunde wurden als Hinweis auf eine Rassendifferenzierung infolge eiszeitlicher Trennungseignisse interpretiert.

Heute ermöglichen genetische Marker, die räumliche und zeitliche Bewegung von Arten durch Analyse von DNA-Sequenzen zu rekonstruieren. In dieser Arbeit werden molekulare Systeme zur Untersuchung der Phylogenetik von *P. chalcographus* vorgestellt und verglichen.

Mitochondriale DNA wurde als einer der ersten Marker in der Phylogenetik eingeführt. Die Verfügbarkeit von über Artgrenzen hinaus anwendbaren Universalprimern und die vergleichsweise hohe Mutationsrate machten mtDNA zu einem idealen Molekül um vergangene populationsgenetische Ereignisse über einige Millionen Jahre hinweg zu untersuchen. Eine Analyse der mtDNA von *P. chalcographus* zeigte eine Unterteilung heute lebender Populationen in mehrere Clades. Der genetische Abstand zwischen diesen Gruppen deutet auf eine allopatrische Entstehung vor etwa einer Million Jahre hin, obgleich die meisten von ihnen heute sympatrisch in ganz Europa vorkommen. Auf Basis der detektierten Mutationen wurden im Rahmen dieser Dissertation spezifische SSCP Primer entwickelt. Die Tauglichkeit der SSCP für die rasche Typisierung von DNA wurde untersucht; die Clades konnten dabei erfolgreich unterschieden werden.

In den letzten Jahren wurde die alleinige Verwendung von mtDNA als genetischer Marker Gegenstand kritischer Diskussion. Mehrere Fälle wurden beschrieben, in denen nukleare Kopien mitochondrialer Gene (numts) zu Artefakten in den

abgeleiteten Stammbäumen führten. Um den vorliegenden mtDNA-Datensatz zu überprüfen wurde eine Strategie verwendet, die durch Amplifikation langer DNA-Abschnitte mögliche numts eliminiert. Der Vergleich dieser Daten mit direkt sequenzierter DNA zeigte, dass im Genom des Kupferstechers keine nuklearen Kopien des untersuchten Zielgens vorkommen.

Ein weiterer Faktor der auf die Zuverlässigkeit mitochondrialer Daten Einfluss nehmen kann ist die Infektion mit *Wolbachia*. Dieser Endosymbiont greift in die Fortpflanzung der Insekten ein und verändert damit auch die Verteilungsmuster der mtDNA. Während in früheren Studien *Wolbachia* in *P. chalcographus* nicht nachgewiesen wurde, zeigten die hier angewandten Methoden (long und nested PCR, Klonierung, *in situ* Hybridisierung), dass zumindest ein gewisser Prozentsatz der europäischen Populationen infiziert ist. Ein Einfluss auf die Verteilung der mtDNA kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden und weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Infektionsraten verschiedener Populationen zu ermitteln.

Nukleare Marker bieten eine Möglichkeit, die Einschränkungen der mtDNA zu umgehen. Die Anwendbarkeit solcher Marker, mit einem Schwerpunkt auf Mikrosatelliten, wurde untersucht. Mikrosatelliten sind kurze Sequenzen, in denen ein 1-6 Nukleotide umfassendes Motiv vielfach wiederholt wird. Besondere Mutationsmechanismen führen zu hohen Substitutionsraten und Polymorphismen in solchen Sequenzen. Lokus-spezifische Primer müssen für jede Spezies, die erstmalig untersucht wird, von neuem entwickelt werden. Verschiedene Methoden zur Isolation von Mikrosatelliten wurden verglichen und sieben polymorphe Loci identifiziert. Verglichen mit vielen anderen Insektenarten sind die Mikrosatelliten des Kupferstechers eher selten, kurz und weniger polymorph.

Als alternativer Ansatz zur Entwicklung nuklearer Marker wurde die Isolierbarkeit von mobilen genetischen Elementen mittels degenerierter Primer untersucht. Drei Sequenzen mit großer Homologie zu bekannten Transposons konnten identifiziert werden und bieten einen Ansatzpunkt für weitere Markerentwicklung.

---

**Table of contents**

Abstract	i
Kurzfassung	iii
Acknowledgements	v
<b>1. Introduction</b>	
1.1 Evolution, speciation and phylogeography	1
1.2 <i>Pityogenes chalcographus</i>	4
1.2.1 Biology	
1.2.2 Race differentiation in <i>P. chalcographus</i>	
1.2.3 Geographic distribution and postglacial recolonization	
1.2.4 Influence of <i>Wolbachia</i>	
1.3 Phylogenetics: molecular approaches	8
1.3.1 Genetic markers	
1.3.2 Animal genomes	
<b>2. Research objectives</b>	
2.1 Mitochondrial DNA	20
2.1.1 Development of SSCP markers	
2.1.2 Validation of mitochondrial origin	
2.1.3 Detection of <i>Wolbachia</i> infections	
2.2 Isolation and characterization of microsatellites	22
2.3 Transposons	23
<b>3. Material and methods</b>	
3.1 General laboratory procedures	24
3.1.1 Frequently used buffers and media	
3.1.2 Insect collection	
3.1.3 Extraction and storage of insect DNA	
3.1.4 PCR amplifications	
3.1.5 Primer design	
3.1.6 Preparation of competent cells	

---

3.1.7	Cloning procedures	
3.1.8	Plasmid purification	
3.1.9	Agarose gel electrophoresis	
3.1.10	Southern hybridization techniques	
3.1.11	DNA sequencing	
3.2	Mitochondrial DNA	31
3.2.1	Design and application of SSCP primers	
3.2.2	<i>In silico</i> analysis of mutations detected in CO1 sequences	
3.2.3	Development of long PCR primers	
3.2.4	Nested PCR	
3.2.5	Identification of <i>Wolbachia</i> infections by long and nested PCR	
3.2.6	Identification of <i>Wolbachia</i> infections by <i>in situ</i> hybridization	
3.3	Microsatellites	37
3.3.1	Production of DIG labelled oligoprobes	
3.3.2	Construction of enriched libraries by agarose bound avidine	
3.3.3	Construction of high stringency enriched libraries using PMPs	
3.3.4	Construction of low stringency enriched libraries using PMPs	
3.3.5	PCR pretesting of plasmid DNA for the presence of SSRs	
3.3.6	Search for microsatellite sequences by vectorette PCR	
3.3.7	Microsatellite genotyping	
3.4	Transposable genetic elements	44
<b>4.</b>	<b>Results and discussion</b>	
4.1	SSCP genotyping of mtDNA	46
4.1.1	European haplotypes of the <i>P. chalcographus</i> CO1 gene	
4.1.2	Potential of clade discrimination using SSCP primers	
4.1.3	Comparison of SSCP and direct sequencing of PCR products	
4.2	Evaluation of possible numt influence on the mtDNA dataset	51
4.2.1	<i>In silico</i> analysis of mutations detected in CO1 sequences	
4.2.2	Development of long PCR primers	
4.2.3	Optimization of long PCR conditions	
4.2.4	long PCR for validation of mtDNA derived phylogenetic data	
4.3	Detection of <i>Wolbachia</i> in <i>P. chalcographus</i>	59
4.3.1	Detection of <i>Wolbachia</i> by PCR	
4.3.2	Detection of <i>Wolbachia</i> by <i>in situ</i> hybridization	
4.4	Interpretation of the integrity of the mtDNA derived dataset	63

---

---

4.5	Microsatellites	64
4.5.1	Isolation of microsatellites using agarose bound avidine	
4.5.2	Development of a PCR based pre-test for SSR content	
4.5.3	Isolation of microsatellites by PMPs	
4.5.4	Primer development and genotyping of <i>P. chalcographus</i> microsatellite loci	
4.5.5	Vectorette PCR	
4.6	Transposable genetic elements	79
<b>5.</b>	<b>Perspectives for future research</b>	
5.1	<i>Wolbachia</i> infection status of <i>P. chalcographus</i>	81
5.2	Nuclear markers	82
<b>6.</b>	<b>References</b>	84
<b>7.</b>	<b>Appendix</b>	
7.1	<i>Pityogenes chalcographus</i> sample collection	96
7.2	Microsatellite sequences	98
7.2.1	<i>Messor structor</i>	
7.2.2	<i>Lasius austriacus</i>	
7.2.3	<i>Pityogenes chalcographus</i>	
7.3	Transposon sequences	107
7.4	Protocols	108
7.4.1	Microsatellite isolation by agarose bound avidine	
7.4.2	Microsatellite isolation by PMPs	
7.4.3	Microsatellite isolation by vectorette PCR	
7.5	Publications in frame of this thesis	118
7.5.1	Articles in SCI journals	
7.5.2	Other articles	
7.5.3	Congress contributions and posters	
7.6	Curriculum vitae	119
7.7	List of abbreviations	120

---