

Molekulare Phylogenie der Feuerwanzen (Hemiptera, Pyrrhocoridae)

Bachelorarbeit

vorgelegt an der Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena

Fachbereich Medizintechnik/ Biotechnologie

Studiengang Biotechnologie

Hochschulbetreuer: Herr Professor Künkel

Bearbeitet von: Franziska Retz

Matrikelnummer: 632266

Studiengang: Biotechnologie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden.....	3
2.1. Material.....	3
2.2. Methoden	6
2.2.1. DNA-Extraktion.....	6
2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	7
2.2.3. Gelelektrophorese.....	10
2.2.4. DNA-Aufreinigung des PCR-Produkts.....	10
2.2.5. Vorbereitung der Sequenzierung	11
2.2.6. Reinigen der Sequenzen und Erstellung der Phylogenie.....	11
3. Ergebnisse.....	12
4. Diskussion.....	18
5. Zusammenfassung.....	20
6. Geräte und Chemikalien.....	22
7. Quellenverzeichnis.....	25

Die vorliegende Arbeit ist aus patent- und publikationsrechtlichen Gründen vertraulich zu behandeln.

1. Einleitung

Feuerwanzen (Pyrrhocoridae) stellen eine Familie der Wanzen (Heteroptera) dar, die mit ihren ca. 400 Arten weltweit verbreitet ist (Günther 2000). Ein Vertreter der Familie, die Art *Pyrrhocoris apterus*, ist ein beliebter Modellorganismus für biologische Untersuchungen von hemimetabolen Insekten (Socha 1993). Charakteristisch für die Familie ist neben der auffallenden rot-schwarzen Warntracht die bevorzugte Ernährung von Pflanzensamen aus der Ordnung der Malvales (Ahmad and Schaefer 1987). So findet man *Pyrrhocoris apterus* häufig unter Linden, da sich diese Art vor allem von den Lindensamen ernährt. Die Vertreter der Gattung *Dysdercus* hingegen, von denen viele als Schädlinge bekannt sind, bevorzugen die Baumwollpflanze als Nahrung. Auch andere Pflanzen kommen als Nahrung für die Pyrrhocoridae in Frage, so werden z.B. Pflanzen der Ordnungen Rosales oder Fabales als Nahrung von einigen Wanzen genutzt (Ahmad and Schaefer 1987). Obwohl die Pyrrhocoridae sich vor allem von pflanzlichem Material ernähren, gibt es auch karnivore Vertreter. So wurde berichtet, dass bei *P. apterus* unter Nahrungsmangel Kannibalismus auftritt und dass die Gattungen *Antilochus* und *Dindymus* vor allem karnivor leben (Ahmad and Schaefer 1987). Trotzdem zeigen bisherige Studien, dass die bevorzugte Nahrung der Pyrrhocoridae Pflanzen aus der Ordnung der Malvales sind (Ahmad and Schaefer 1987; Socha 1993).

Die Feuerwanzen tragen in ihrem Verdauungstrakt Mikroorganismen, die ihnen als Symbionten vermutlich bei der Versorgung mit Vitaminen helfen (Salem et al. eingereicht). *P. apterus* weist in einem der Darmabschnitte, der so genannten M3-Region, eine einzigartige Mikroorganismenflora auf. Dort treten vor allem die Aktinobakterien *Coriobacterium glomerans* und *Gordonibacter sp.* auf sowie auch Alpha- (Rickettsiales) und Gamma-Proteobakterien (Enterobacteriaceae) und Firmicutes (*Clostridium sp.* und *Lactococcus lactis.*) (Sudakaran et al. eingereicht). Auch bei einem anderen Vertreter der Pyrrhocoridae, *Dysdercus fasciatus*, konnte eine ähnliche Mikroorganismenflora in der Darmregion M3 gefunden werden, die sich vor allem aus *Coriobacterium glomerans*, *Gordonibacter sp.* und *Clostridium sp.* zusammensetzt (Salem et al. eingereicht). Die Wichtigkeit der Mikroorganismen für *P. apterus* und *D. fasciatus* wurde in Versuchen mit symbionten-freien Tieren

(Aposymbionten) gezeigt. Wanzen, die keine Symbionten enthielten, hatten eine höhere Sterblichkeitsrate und entwickelten sich langsamer als Wanzen mit der natürlichen Mikroorganismenflora (Salem et al. eingereicht). *Coriobacterium glomerans* und *Gordonibacter sp.* wurden in vielen weiteren Arten der Pyrrhocoridae gefunden (Sudakaran, in Vorbereitung), was auf eine ähnliche Zusammensetzung der Mikroorganismenflora innerhalb der Familie hinweist. Da die am häufigsten in M3 auftretenden Bakterienarten auch auf oder in den Eiern von *P. apterus* gefunden wurden, wird davon ausgegangen, dass die Symbionten vertikal übertragen werden, was im Bezug auf *C. glomerans* bereits für *P. apterus* gezeigt werden konnte (Kaltenpoth et al. 2009). Die vertikale Übertragung der Symbionten bindet beide Symbiosepartner enger aneinander, als es bei einer Aufnahme der Symbionten aus der Umwelt der Fall wäre. Die gegenseitige Beeinflussung von Wirt und Symbionten kommt so stärker zum Tragen und die Anpassung aneinander kann sich in einer coevolutionären Entwicklung zeigen.

Andere Familien der Infraordnung Pentatomomorpha tragen andere Symbionten als *P. apterus* in sich, die meist in speziellen Bereichen wie z.B. Krypten oder Bakteriomen lokalisiert sind (Fukatsu and Hosokawa 2002; Hosokawa et al. 2010; Kikuchi et al. 2011; Prado and Almeida 2009). Dies weist darauf hin, dass sowohl die Position der Mikroorganismen in den Wanzen als auch die Zusammensetzung der Mikroorganismenflora in *P. apterus* einzigartig für die Vertreter der Überfamilie der Pyrrhocoroidea sein könnten. Die Symbiose zeigt möglicherweise das Resultat einer langen gemeinsamen Evolutionsgeschichte der Symbionten und ihres Wirtes (Sudakaran et al. eingereicht). Allerdings ist nicht nur über die Evolution der Symbiose bisher wenig bekannt, sondern auch über die der Wirtsorganismen (Weirauch and Schuh 2011). Obwohl sich molekulare Studien mit den Superfamilien innerhalb der Infraordnung Pentatomomorpha beschäftigt haben, fehlt es an kladistischen Studien über die Superfamilie Pyrrhocoroidea, zu der auch die Familie der Pyrrhocoridae gehört (Weirauch and Schuh 2011). In ihrer zusammenfassenden Arbeit bezeichnen Weirauch and Schuh (2011) die kladistische Analyse der Pyrrhocoroidea als eine der wichtigsten Prioritäten in der Erforschung der Pentatomomorpha.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der molekularen Marker 18S rRNA und COX1 eine molekulare Phylogenie der Pyrrhocoridae zu rekonstruieren und damit die bisher unbekanntes verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb der Familie aufzuzeigen. Das Verständnis über die Evolution der Feuerwanzen soll vor allem als Grundlage für die Untersuchung der Symbiose mit den Mikroorganismen und der eventuellen Co-Evolution von Wirten und Symbionten dienen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Es wurden 20 Arten der Familie Pyrrhocoridae, 3 Vertreter der Familie Lygaeidae, und je eine Art der Familien Largidae und Rhopalidae aus insgesamt 6 verschiedenen Ländern untersucht (Tab. 1). Die Vertreter der Familien Lygaeidae, Largidae und Rhopalidae wurden als Außengruppe (Outgroup) eingesetzt. Die verwendeten Wanzen wurden als Präparat in Ethanol bzw. als DNA-Probe von der Arbeitsgruppe Insektensymbiosen des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurde *Physopelta quadriguttata* verwendet, dessen Sequenzen der Genabschnitte, die in dieser Arbeit von Interesse sind, der Datenbank GenBank (Accession number AY627350.1 und AY742882.1) entnommen wurden. Außer den als Outgroup gekennzeichneten Spezies handelt es sich bei den untersuchten Wanzenarten um Vertreter der Familie Pyrrhocoridae. *P. quadriguttata* gehört zur selben Überfamilie, der Pyrrhocoroidea, wird aber einer anderen Familie, der Largidae, zugeordnet.

Als molekulare Marker wurden die ribosomale 18S-Sequenz und die COX1-Sequenz eingesetzt. Die verwendeten Primer (Li et al. 2005) für die Amplifikation und Sequenzierung dieser phylogenetisch informativen Gene sind in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 1: Zur Rekonstruktion der molekularen Phylogenie der Pyrrhocoridae verwendete Wanzenarten

Species	Family	Location
<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Pyrrhocoridae	Germany
<i>Dysdercus fasciatus</i>	Pyrrhocoridae	Africa
<i>Dysdercus voelkeri</i>	Pyrrhocoridae	Africa
<i>Cenaeus carnifex</i>	Pyrrhocoridae	Africa
<i>Probergrothius sexpunctatis</i>	Pyrrhocoridae	Africa
<i>Dysdercus suturellus</i>	Pyrrhocoridae	USA
<i>Dysdercus andreae</i>	Pyrrhocoridae	USA
<i>Pyrrhocoris sibiricus</i>	Pyrrhocoridae	Japan
<i>Antilochus coqueberti</i>	Pyrrhocoridae	Japan
<i>Dysdercus poecilus</i>	Pyrrhocoridae	Japan
<i>Dysdercus decussates</i>	Pyrrhocoridae	Japan
<i>Dysdercus cingulatus</i>	Pyrrhocoridae	India
<i>Dysdercus olivaceus</i>	Pyrrhocoridae	India
<i>Dindymus sp.</i>	Pyrrhocoridae	India
<i>Dindymus lanius</i>	Pyrrhocoridae	India
<i>Probergrothius nigrisoris</i>	Pyrrhocoridae	India
<i>Probergrothius sanguinoleus</i>	Pyrrhocoridae	India
<i>Antilochus nigripes</i>	Pyrrhocoridae	India
<i>Dermatinus sp.</i>	Pyrrhocoridae	India
<i>Scanthius obscurus</i>	Pyrrhocoridae	India
<i>Leptocoris augur</i> (Outgroup)	Rhopalidae	India
<i>Lygaeus equestris</i> (Outgroup)	Lygaeidae	Russia
<i>Oxycarenus hyalipennis</i> (Outgroup)	Lygaeidae	India
<i>Spilostethus hospes</i> (Outgroup)	Lygaeidae	India
<i>Physopelta quadriguttata</i> (Outgroup)	Largidae	Sequence was taken from GenBank

Tabelle 2: Für die Amplifikation und Sequenzierung phylogenetisch informativer Gene der Pyrrhocoridae verwendete Primer

Name	Sequenz (5' - 3')	vorwärts/ rückwärts	Target
Pyr18S_2F	GGGAGGTAGTGACAAAAATAACG	vorwärts	ribosomale 18S-Sequenz, Pyrrhocoridae
Pyr18S_4F	ATCCTTTAACGAGGATCTATTGG	vorwärts	
Pyr18S_3R	ACATACTTGGCAAATGCTTTTCGC	rückwärts	
Pyr18S_4R	GTTAGAACTAGGGCGGTATCTG	rückwärts	
C1-J-2183-F	CAACATTTATTTTGATTTTTTGG	vorwärts	COX1-Sequenz, Pyrrhocoridae
C1-J-2530-F	GGAGTAATTCTAGCCAATC	vorwärts	
C1-N-2609-R	GAATACTGCTCCTATGGATA	rückwärts	
TL2-N-3014-R	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	rückwärts	

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus den Wanzen (Tabelle 1) erfolgte mit dem Epicentre MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre Technologies). Die Proben wurden in 70 %igem Ethanol bei -20 °C aufbewahrt. Für die DNA-Extraktion wurden die Wanzen, je nach Größe, in ein 1,5 ml oder 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit flüssigem Stickstoff übergossen und mit Hilfe eines Pistills zerkleinert. Die zerkleinerten Proben wurden jeweils mit 300 µl Tissue and Cell Lysis Solution und 4 µl Lysozym (100 mg/ml) versetzt und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C im Heizblock, unter kontinuierlichem Schütteln, inkubiert. Dadurch wurden die Zellen lysiert, was zur Freisetzung der DNA führte. Im Anschluss daran wurden 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) hinzugegeben und für 15 Minuten bei 62 °C inkubiert, wodurch die in den Proben enthaltenen Proteine abgebaut wurden. Danach wurden die Proben für 3-5 Minuten auf Eis gestellt, um die Proteinase-Reaktion zu beenden. Anschließend wurden je 150 µl MPC Protein Precipitation Reagent zu den Proben gegeben, mit einem automatischen Schüttler (Vortex) für 10 Sekunden gemischt und danach bei 10.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Dies hatte die Ausfällung und Abtrennung der verbliebenen Proteine und Gewebereste zur Folge. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (das Pellet wurde für eventuelle weitere Versuche bei -20 °C aufbewahrt). Zur Fällung der Nukleinsäuren wurden die Proben mit 500 µl 2-Propanol versetzt, gründlich gemischt und über Nacht bei -20 °C aufbewahrt. Die Proben wurden anschließend bei 14.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, um die ausgefällte DNA zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Es wurden 200 µl kalter 70 %iger Ethanol hinzugegeben und für 5 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert, um das Pellet zu waschen. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und verworfen. Die Proben wurden für 1 Stunde unter dem Abzug getrocknet und anschließend in 50 µl autoklaviertem, gefiltertem Millipore-Wasser resuspendiert. Die gewonnenen DNA-Extrakte wurden bei -20 °C für die nachfolgenden Versuche aufbewahrt.

2.2.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation der ausgewählten Genabschnitte der Feuerwanzen wurde die PCR in einem Reaktionsvolumen von je 12,5 µl mit folgenden Reagenzien durchgeführt: 1 µl DNA-Probe, 6,4 µl gefiltertes Millipore Wasser, 1,25 µl Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 % TritonX-100), 0,25 µl MgCl₂ (2,5 mM), 1,5 µl dNTPs (2mM), je 10 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer und 0,5 U Taq-Polymerase (VWR, Darmstadt, Germany). Es wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt um eine Kontamination der verwendeten Reagenzien auszuschließen. Im Falle der Negativkontrolle wurde anstelle des Templates autoklaviertes, gefiltertes Millipore Wasser verwendet.

Für die Amplifikation von Teilen des ribosomalen 18S-Gens der Feuerwanzen wurden die Primer Pyr18s_2F und Pyr18s_4R (Tabelle 2) verwendet. Für *Probergrothius sexpunctatis* konnte mit diesen Primern kein PCR-Produkt gewonnen werden, daher wurden hier zusätzlich interne Primer eingesetzt, sodass mit den Primerpaaren Pyr18s_2F/ Pyr18s_3R und Pyr18s_4F/ Pyr18s_4R (Tabelle 2) amplifiziert wurde. Die Amplifikation der COX1-Sequenz erfolgte mit dem Primerpaar C1-J-2183-F / TL2-N-3014-R (Tabelle 2). Die PCR wurde im Thermocycler (Biometra, T-Professional Thermocycler Gradient 96) mit PCR-Programm 1 durchgeführt (Tabelle 3).

Da auf diesem Wege nicht für alle Proben ein PCR-Produkt des Genabschnittes COX1 erhalten wurde, wurden zwei weitere PCR-Ansätze eingesetzt, einer unter Verwendung der Pfu DNA-Polymerase, der zweite unter Verwendung der PfuPLUS DNA-Polymerase. Die PCR wurde ebenfalls in einem Reaktionsvolumen von je 12,5 µl mit den folgenden Reagenzien durchgeführt: 1 µl DNA-Probe, 6,75µl gefiltertes Millipore Wasser, 1,25 µl Puffer (200 mM Tris/HCl pH 8,8, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 1 mg/ml BSA, 1 % TritonX-100, 20 mM MgSO₄), 1,25 µl dNTPs (2mM), je 10 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer und 0,625 U Pfu DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) bzw. 0,625 U PfuPLUS DNA-Polymerase (EURx). Es wurde wie oben beschrieben eine Negativkontrolle mitgeführt. Die verwendeten Primer waren C1-J-2183-F und TL2-N-3014-R (Tabelle 2). Die PCR wurde im Thermocycler (Biometra, T-Professional Thermocycler Gradient 96) durchgeführt (Tabelle 3, PCR-Programm 2

für den PCR-Ansatz mit Pfu DNA-Polymerase und PCR-Programm 3 für den PCR-Ansatz mit PfuPLUS DNA-Polymerase). Welches PCR-Programm und welche DNA-Polymerase für die Amplifikation der COX1-Sequenz verwendet wurden, ist der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 3: PCR-Programme im Thermocycler zur Amplifikation der ausgewählten Genabschnitte

PCR-Programm 1			
Schritt	Temperatur (in °C)	Dauer (mm:ss)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	05:00	1
Denaturierung	95	00:30	35
Annealing	50	00:40	
Elongation	72	02:00	
Endelongation	72	08:00	1
PCR-Programm 2			
Schritt	Temperatur (in °C)	Dauer (mm:ss)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	03:00	1
Denaturierung	95	00:30	35
Annealing	50	00:30	
Elongation	72	02:30	
Endelongation	72	05:00	1
PCR-Programm 3			
Schritt	Temperatur (in °C)	Dauer (mm:ss)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	03:00	1
Denaturierung	95	00:30	35
Annealing	50	00:30	
Elongation	72	01:00	
Endelongation	72	07:00	1

Tabelle 4: Zur Amplifikation der COX1-Sequenz verwendete DNA-Polymerasen und PCR-Programme

Art	DNA-Polymerase	PCR-Programm
<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Taq	1
<i>Dysdercus fasciatus</i>	Taq	1
<i>Dysdercus voelkeri</i>	PfuPLUS	3
<i>Cenaeus carnifex</i>	Pfu	2
<i>Probergrothius sexpunctatis</i>	PfuPLUS	3
<i>Dysdercus suturellus</i>	Taq	1
<i>Dysdercus andreae</i>	Taq	1
<i>Pyrrhocoris sibiricus</i>	Taq	1
<i>Antilochus coqueberti</i>	PfuPLUS	3
<i>Dysdercus cingulatus</i>	Taq	1
<i>Dysdercus poecilus</i>	Taq	1
<i>Dysdercus decussates</i>	Pfu	2
<i>Dysdercus cingulatus</i>	Taq	1
<i>Dysdercus olivaceus</i>	Pfu	2*
<i>Dindymus sp.</i>	Pfu	2
<i>Dindymus lanius</i>	Pfu	2
<i>Probergrothius nigricoris</i>	Pfu	2
<i>Probergrothius sanguinoleus</i>	Pfu	2
<i>Antilochus nigripes</i>	Pfu	2
<i>Dermatinus sp.</i>	Pfu	2
<i>Scanthius obscurus</i>	Pfu	2
<i>Leptocoris augur</i> (Outgroup)	Taq	1
<i>Lygaeus equestris</i> (Outgroup)	Taq	1
<i>Oxycarenus hyalipennis</i> (Outgroup)	Taq	1
<i>Spilostethus hospes</i> (Outgroup)	Taq	1

*abweichende Annealing- Temperatur: 45 °C

2.2.3. Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der erfolgreichen PCR wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Zunächst wurde ein 1,5 %iges -Agarosegel mit 0,75 mg Agarose und 50 ml 1 x TBE-Puffer hergestellt. Hierzu wurden die benannten Reagenzien in einer Mikrowelle erhitzt. Dem flüssigen Gel wurden 5 µl GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) hinzugegeben, welches die DNA unter UV-Licht sichtbar macht. Das Agarosegel wurde in einen entsprechenden Rahmen gegossen und ca. 30 Minuten abgekühlt, um die Agarose zu polymerisieren. Anschließend wurde das Gel mit je 4 µl PCR-Produkt sowie 2 µl Ladepuffer beladen. Um die Größe des PCR-Produktes feststellen zu können, wurde ebenfalls ein Größenstandard (100 bp GeneRuler, VWR) auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief 30 Minuten bei 150 V. Die Auswertung erfolgte unter Nutzung der GeneSnap Software (GeneSnap7.09.06, Syngene, Cambridge, United Kingdom) in einer UV-Gel-Dokumentationskammer (UVP).

2.2.4. DNA-Aufreinigung des PCR-Produkts

Die DNA-Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgte laut peqGOLD MicroSpin Cycle Pure Kit (PeqLab). Zunächst wurden 50 µl CP-Puffer und 5 µl PCR-Produkt in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit einem automatischen Schüttler geschüttelt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf die PerfectBind MicroSpin DNA-Säule gegeben und zusammen mit einem 2 ml Sammel-Tube für 2 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert, wobei die DNA an die Silikamembran der Zentrifugensäule bindet, während Verunreinigungen ausgewaschen werden. Der Säulendurchfluss wurde verworfen und die Zentrifugensäule auf ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Nun wurden 10 µl Elutionspuffer direkt auf die Zentrifugensäule pipettiert, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 Minute bei 8.000 x g zentrifugiert. Dadurch wurde die DNA wieder von der Membran gelöst. Das gereinigte PCR-Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5. Vorbereitung der Sequenzierung

Zunächst wurde aus dem gereinigten PCR-Produkt die DNA-Konzentration mittels Nanodrop-Photospektrometer (ND1000, PeqLab, Erlangen, Germany) ermittelt. Es wurde je ein Ansatz mit Vorwärts- und einer mit Rückwärtsprimer vorbereitet, wobei die gleichen Primer wie in der PCR verwendet wurden. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde auf eine Konzentration von 25-40 ng/μl verdünnt. Zu 1 μl gereinigtem PCR-Produkt wurden 1 μl Primer und 4 μl Merck-Wasser hinzu pipettiert. Die Sequenzierung selbst wurde in der Abteilung Entomologie des MPI für chemische Ökologie auf einem Kapillarsequenzierer (3730XL, Applied Biosystem) unter Verwendung des Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem) durchgeführt.

2.2.6. Reinigen der Sequenzen und Erstellung der Phylogenie

Die Sequenzen wurden in das Programm Geneious 5.3.4 importiert und die zusammengehörenden Sequenzen (mit Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer amplifiziert) assembliert. Die Sequenzen wurden optisch überprüft, gegebenenfalls Enden mit qualitativ schlechten Signalen entfernt oder unklare Signale mit den Nukleotidsubstituenten ersetzt. Darauf folgend wurden die bereinigten Sequenzen in MEGA 5.05 übertragen. Die Sequenzen des COX1-Gens wurden, da sie proteinkodierend sind, mit Hilfe des Programms in die Aminosäuresequenzen übersetzt und anschließend im Proteinleserahmen aligned. Für die Sequenzen der 18S-rRNA war eine Übersetzung in die Aminosäuresequenz nicht möglich, da es sich um einen nicht proteinkodierenden Genabschnitt handelt. Mit Hilfe des Programms MEGA 5.05 und der Maximum Likelihood Methode wurde anschließend für die verwendeten Genabschnitte eine Phylogenie rekonstruiert. Die Robustheit der Rekonstruktionen wurde mit Bootstrap-Suchen (1000 Replikate) überprüft.

Für die Rekonstruktion einer Phylogenie, die die Informationen sowohl des 18S-rRNA-Gens, als auch die der COX1-Sequenz berücksichtigt, wurden die entsprechenden Sequenzen zunächst in BioEdit 7.0.9 überführt und dort kombiniert. Zum einen wurden die Daten erneut in MEGA 5.05 kopiert und dort ein Stammbaum mit denselben Methoden wie für die einzelnen Genabschnitte beschrieben, berechnet. Zum anderen wurde eine Bayesian-Phylogenie der kombinierten Sequenzen mit dem Programm

Mr. Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2001; Ronquist and Huelsenbeck 2003) erstellt. Hierzu wurden die Daten in zwei Partitionen unterteilt, in die des 18S-rRNA-Gens und in die des COX1-Gens. Zur Kalkulation wurde das GTR+G Modell mit sechs „rate categories“ verwendet. Jede Analyse wurde mit 1 000 000 Generationen durchgeführt, wobei Stammbäume alle 1000 Generationen gespeichert wurden. Die ersten 100 Bäume wurden in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt. Es wurde sichergestellt, dass die Standardabweichung der „split frequencies“ zum Ende der Analyse hin konstant unter 0,01 war. Aus den gespeicherten Bäumen wurde ein 50 % majority rule consensus tree mit „posterior probability“-Werten für jeden Knoten berechnet. Dem Stammbaum wurden anschließend die Bootstrapwerte der kombinierten Analyse der Genabschnitte 18s-rRNA und COX1 mit der Maximum Likelihood Methode hinzugefügt. Ebenfalls wurden die Ergebnisse einer mikrobiellen Untersuchung der Mikroorganismenflora der Wanzen (Sudakaran, in Vorbereitung) auf die Wirtsphylogenie übertragen.

3. Ergebnisse

Für die untersuchten 20 Arten der Familie Pyrrhocoridae, 3 Arten der Familie Lygaeidae, einen Vertreter der Familien Largidae und Rhopalidae wurden die 18s-rRNA- (407 bp) und COX1- Sequenzen (571 bp) erhalten. Die Bayesian-Phylogenie der kombinierten Sequenzen mit dem Programm Mr. Bayes 3.1.2 ist in Abbildung 1 dargestellt. Neben den posterior probability-Werten sind auch die Bootstrapwerte der Maximum Likelihood Analyse der kombinierten Sequenzen neben den Knoten zu erkennen. Die Ergebnisse der beiden Methoden waren auf niedriger taxonomischer Ebene übereinstimmend. Alle untersuchten Arten der Gattung *Dysdercus* bilden zusammen mit *Antilochus coqueberti* eine monophyletische Gruppe. *D. decussates* steht an der Basis dieser Klade. Die Auflösung innerhalb der Gruppe wird durch hohe posterior probability- und Bootstrapwerte gestützt. *Antilochus nigripes* ist im Stammbaum als nächster Verwandter von *D. cingulatus* zu finden. Als Schwestergruppe der Gattung *Dysdercus* zeigt sich *Dermatinus sp.* Die Vertreter der Gattung *Pyrrhocoris* bilden eine gemeinsame Klade. Allerdings sind die Positionen von *Dindymus sp.*, *Cenaeus carnifex* und *Scanthius sp.* innerhalb der Phylogenie nicht gut aufgelöst und finden generell geringe statistische Unterstützung. Die Vertreter der

Gattung *Probergrothius* bilden eine monophyletische Gruppe mit *P. sexpunctatis* als der basalen Art. *Dindymus lanius* und *Antilochus nigripes* bilden eine Klade. Die beiden untersuchten Vertreter der Gattung *Dindymus* gruppieren demnach nicht zusammen, wie auch die Vertreter der Gattung *Antilochus* keine gemeinsame Klade bilden.

Alle Vertreter der Familie Pyrrhocoridae bilden eine monophyletische Gruppe. An deren Basis steht *Physopelta quadriguttata* als Vertreter der Schwesterfamilie Largidae. Die Superfamilie der Pyrrhocoroidea, zu der die Pyrrhocoridae und die Largidae gehören, bildet ebenfalls eine monophyletische Gruppe. An der Basis zu den Pyrrhocoroidea bilden die als „Outgroup“ definierten Arten *Spilotethus hospes*, *Lygaeus equestris*, *Oxycareus hyalipennis* und *Leptocoris augur* eine Klade. Diese Arten gehören zur selben Infraordnung wie die Pyrrhocoroidea, werden allerdings in andere Familien eingeordnet. *L. augur* gehört zur Familie der Rhopalidae, während *S. hospes*, *L. equestris* und *O. hyalipennis* den Lygaeidae zugeordnet werden.

Allgemein sind die Verzweigungen und somit die Verwandtschaftsverhältnisse auf niedrigster taxonomischer Ebene gut durch posterior probability- und Bootstrapwerte unterstützt, während die Knoten auf höherer Ebene nur eine sehr geringe Unterstützung aufweisen und somit keine Auflösung dieser Knoten erreicht werden konnte.

In allen Vertretern der Familie Pyrrhocoridae, mit Ausnahme von *Dermatinus sp.* und *C. carnifex*, sind Aktinobakterien zu finden (Abb. 1). In *D. poecilus* und *P. sexpunctatis* wurde *C. glomerans*, in *A. nigripes* und *P. sanguinoleus* *Gordonibacter sp.* gefunden. In den anderen Pyrrhocoriden treten beide Arten gemeinsam auf. Die Verteilung der Symbionten folgt offenbar keinem geographischen Muster, sondern einem phylogenetischen. Die Vertreter der Außengruppe weisen diese Symbionten nicht auf.

Das Ergebnis der Maximum Likelihood Analyse, der die COX1-Sequenz zugrunde lag, ist in Abbildung 2 dargestellt. Die erstellte Phylogenie stimmt im Allgemeinen mit dem Stammbaum aus Abbildung 1 überein. Unterschiede zeigen sich darin, dass hier bereits die Position von *D. decussates* nicht eindeutig klar ist und als sein nächster Verwandter *Dermatinus sp.* steht. Des Weiteren steht in diesem Stammbaum die Gattung *Pyrrhocoris* an der Basis der Pyrrhocoridae. *P. quadriguttata* zeigt sich als

Schwestergruppe von *L. augur* und *O. hyalipennis* und nicht wie im Stammbaum der kombinierten Sequenzen als Schwestergruppe der Pyrrhocoridae. Alle Vertreter der „Outgroups“ bilden eine monophyletische Klade.

Das Ergebnis der Maximum Likelihood Analyse des 18S-rRNA- Gens ist in Abbildung 3 zu finden. Die Phylogenie stimmt im Allgemeinen mit dem Stammbaum aus Abbildung 1 überein. Unterschiede ergeben sich vor allem in internen Knotenpunkten, die allerdings durch sehr schlechte Bootstrapwerte unterstützt sind, und daher nicht berücksichtigt werden. Durch sehr gute Bootstrapwerte werden hingegen die Knotenpunkte der niedrigen taxonomischen Level unterstützt. Im Unterschied zur Analyse der COX1-Sequenz bildet die Gattung *Antilochus* mit *A. nigripes* und *A. coqueberti* hier eine monophyletische Gruppe. Die Position von *Dermatinus sp.* ist nur schlecht aufgelöst. Die Gattung *Probergrothius* bildet zwar eine monophyletische Gruppe, allerdings bilden hier *P. sanguinoleus* und *P. sexpunctatis* eine Klade. Die Outgroups *L. augur* und *O. hyalipennis* bilden keine gemeinsame Klade, sondern *O. hyalipennis* tritt als Schwestergruppe zu der Klade von *L. equestris* und *S. hospes* auf.

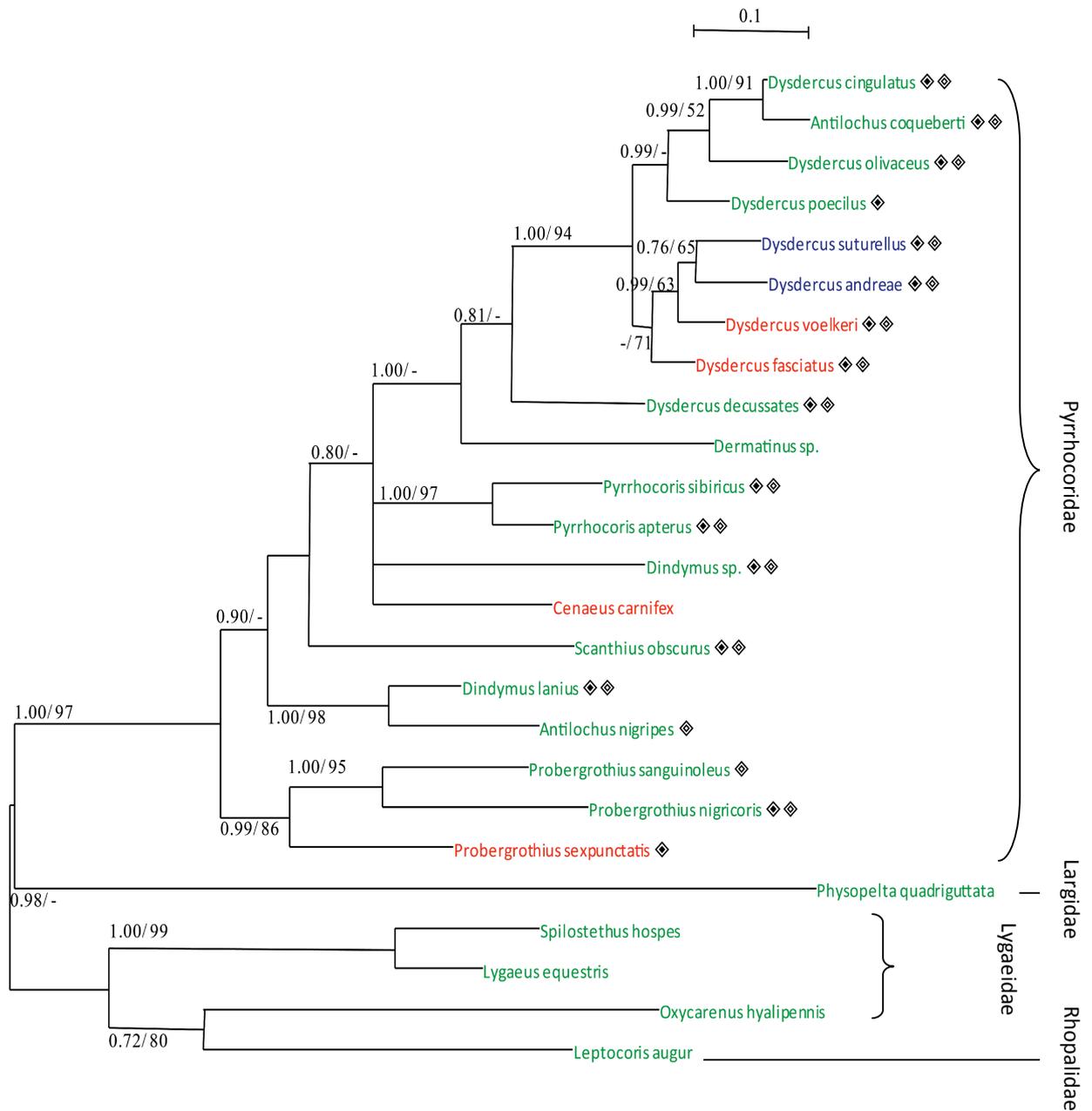


Abbildung 1: Bayesian-Phylogenie der Feuerwanzen aus den kombinierten Sequenzen von 18s-rRNA und COX1 unter Verwendung des Programms Mr. Bayes; Es wurden die Bootstrapwerte der kombinierten Analyse der Genabschnitte mit der Maximum Likelihood Methode in folgender Schreibweise ergänzt: posterior probability–Wert/ Bootstrapwert; Die Wanzenarten wurden nach ihrem Ausbreitungsraum farblich gekennzeichnet: grün–Eurasien, blau–Nordamerika, rot–Afrika; Das Vorkommen von Aktinobakterien wurde folgendermaßen gekennzeichnet: ◇ *Coriobacterium glomerans* anwesend, ◇ *Gordonibacter* anwesend

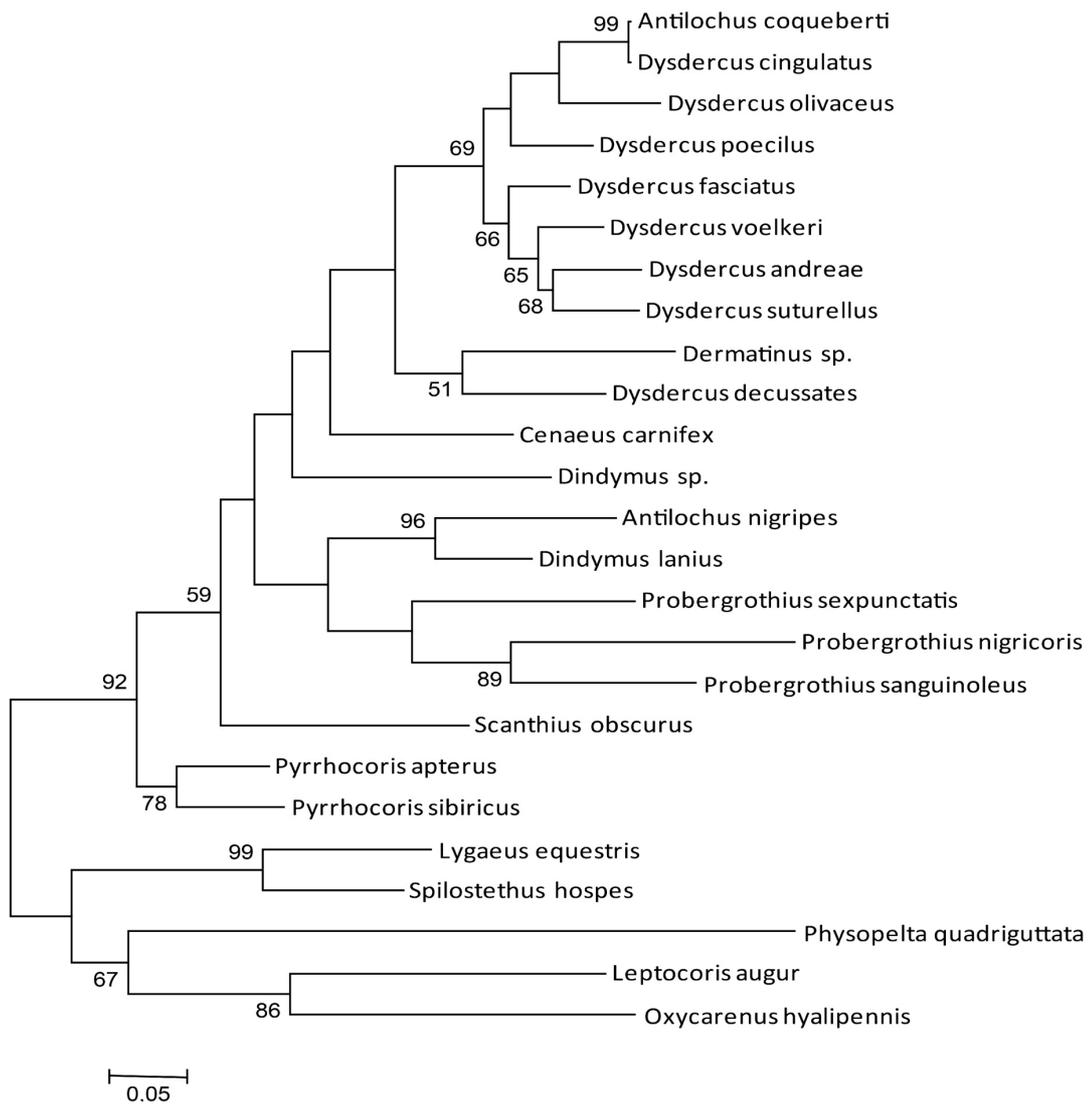


Abbildung 2: Stammbaum der Feuerwanzen auf Grundlage der Maximum Likelihood Analyse in MEGA 5.05 für die COX1-Sequenz; die Bootstrapwerte sind an den Knotenpunkten gekennzeichnet

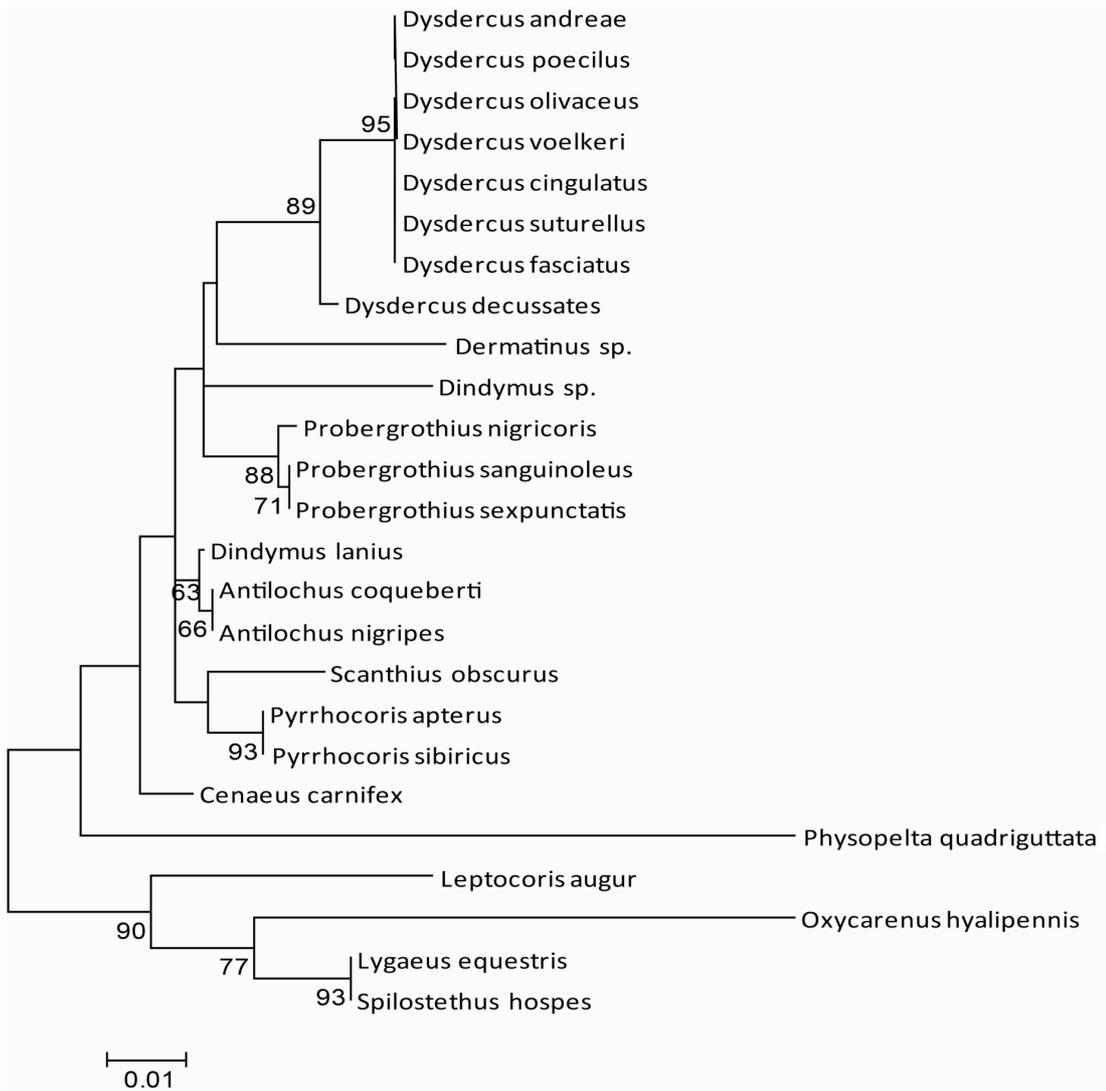


Abbildung 3: Stammbaum der Feuerwanzen auf Grundlage der Maximum Likelihood Analyse in MEGA 5.05 für die 18s-rRNA-Sequenz; die Bootstrapwerte sind an den Knotenpunkten gekennzeichnet

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die phylogenetischen Beziehungen von 20 Arten der Feuerwanzen (Hemiptera, Pyrrhocoridae) auf der Basis eines nukleären (18s-rRNA) und eines mitochondrialen (COX1) Genabschnittes untersucht. In allen rekonstruierten Phylogenien bilden die Pyrrhocoridae eine monophyletische Gruppe. Im Allgemeinen stimmen die Stammbäume, die mit den unterschiedlichen Genabschnitten 18S rRNA und COX1 unter Verwendung der Maximum Likelihood Methode erstellt wurden und die Stammbäume, die mit den kombinierten Daten der Genabschnitte unter Verwendung der Maximum Likelihood Methode erstellt wurden bzw. die Bayesian-Phylogenie, überein. Es können sich aber Unterschiede dadurch ergeben, dass die verwendeten Genabschnitte unterschiedlich starken Veränderungen unterliegen. Das Gen der 18S rRNA ist stark konserviert, so kann mit diesem Genabschnitt z.B. keine Auflösung innerhalb der Gattung *Dysdercus* erreicht werden (Abb. 3). Unter Verwendung der COX1-Sequenz zur Rekonstruktion der Phylogenie ist es jedoch möglich, die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb dieser Gattung aufzuzeigen (Abb. 2), da das Gen für COX1 höhere Substitutionsraten aufweist. Unterschiede zwischen den Stammbäumen, die sich an den inneren Knotenpunkten ergeben, sind durch geringe Bootstrap- oder geringe posterior probability-Werte nur schlecht unterstützt. Am aussagekräftigsten ist die Bayesian-Phylogenie der kombinierten Sequenzen (Abb. 1), da hier eine längere Sequenz mit einem komplexeren Verfahren untersucht wird und bei der Bayesian-Phylogenie die beiden Gene als Partitionen definiert und analysiert werden können.

Es fällt auf, dass *Antilochus coqueberti* bei der Rekonstruktion der Phylogenie unter Verwendung der COX1-Sequenz keine Klade mit *Antilochus nigripes* bildet (Abb. 2), sondern mit *Dysdercus cingulatus*, was durch hohe Bootstrap-Werte gestützt wird. Auch in der Bayesian-Phylogenie fällt *A. coqueberti* in eine Klade mit *D. cingulatus* (Abb. 1). Es ist davon auszugehen, dass statt *A. coqueberti* seine Beute, *D. cingulatus*, amplifiziert wurde, da es bekannt ist, dass die Gattung *Antilochus* räuberisch lebt und sich von Vertretern der Gattung *Dysdercus* ernährt (Ahmad and Schaefer 1987; Socha 1993). Um das Problem der möglichen Amplifikation von Beutetier-DNA zu umgehen, wurden von den anderen räuberischen Arten anstelle eines DNA-Extraktes der ganzen

Wanze, DNA-Extrakte der Beine zur Amplifikation der COX1-Sequenz, die nicht durch die Beute kontaminiert sein können, verwendet. Bei *A. coqueberti* war dies nicht möglich, da kein weiteres Material zur Extraktion vorlag. Bei der Amplifikation der 18S-Sequenz und der Phylogeniekonstruktion auf deren Basis trat das Problem der Beutetier-DNA Amplifikation nicht auf. *A. coqueberti* bildet eine monophyletische Gruppe mit *A. nigripes* (Abb. 3), was auf Grund der Einordnung in dieselbe Gattung auch zu erwarten war. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Amplifikation der Beutetier-DNA könnte darin liegen, dass das Gen für die 18S-rRNA im Zellkern vorliegt, welcher durch eine einfache poröse Membran umhüllt ist, während das Gen für COX1 im Mitochondrium vorliegt, welches von einer Doppelmembran umhüllt wird. Durch die unterschiedliche Membranhüllung wäre es denkbar, dass die Zellkerne eines Beutetiers relativ schnell verdaut werden, sodass in einer PCR keine 18S-Sequenzen der Beute gefunden werden, während die doppelt umhüllten Mitochondrien und ihr Genmaterial bei der Verdauung länger erhalten bleiben. Des Weiteren liegen in einer Zelle deutlich mehr Mitochondrien vor als Zellkerne, was ebenfalls zu einer höheren Wahrscheinlichkeit führt, mitochondriale Gene eines Beutetieres zu amplifizieren als Gene, die im Zellkern verschlüsselt sind.

Nach der Einordnung von *Dindymus lanius* und *Dindymus sp.* in dieselbe Gattung wäre zu erwarten, dass beide Arten eine gemeinsame monophyletische Gruppe bilden. Die Position von *Dindymus sp.* ist in keinem der Stammbäume gut aufgelöst, jedoch wird ersichtlich, dass die erfassten Sequenzen keine nahe Verwandtschaft zwischen *D. lanius* und *Dindymus sp.* aufzeigen (Abb. 1- 3). In diesem Fall wird nicht davon ausgegangen, dass es sich um die DNA-Amplifikation eines Beutetieres handelt, da die Einordnung in allen drei Stammbäumen die gleiche ist und kein Unterschied zwischen der Einordnung im Stammbaum auf Basis der 18S-rRNA und der Einordnung in den anderen Phylogenien zu erkennen ist. Es ist zu vermuten, dass *Dindymus sp.* falsch bestimmt wurde und tatsächlich einer anderen Gattung angehört.

Bei nahezu allen untersuchten Arten der Pyrrhocoridae wurden die Aktinobakterien, *Coriobacterium glomerans* und *Gordonibacter sp.*, welche beide zur Familie der Coriobacteriaceae gehören, gefunden (Sudakaran, in Vorbereitung). Die Ergebnisse der mikrobiellen Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit auf die

Wirtsphylogenie übertragen, um die Verteilung der Symbionten zu untersuchen. Bereits bei Vertretern anderer Familien derselben Infraordnung Pentatomomorpha treten die genannten Aktinobakterien nicht auf (Abb. 1). Es ist zu vermuten, dass bei der Abspaltung der Pyrrhocoridae von den Largidae die Aufnahme der Symbionten eine Rolle gespielt hat und dass sich Symbionten und Wirt seit dem unter gegenseitig ausgeübtem Selektionsdruck gemeinsam entwickelt haben.

Die Symbionten erreichen in *P. apterus* erst signifikante Mengen, wenn die Wanzen beginnen sich von pflanzlichem Material zu ernähren, obwohl sie über alle Entwicklungsstufen bereits vorhanden sind (Salem et al. eingereicht). Dadurch wird angenommen, dass die Symbionten eine wichtige Rolle bei der Ergänzung der Ernährung der Wanzen durch die Bereitstellung von Vitaminen spielen (Salem et al. eingereicht). Es wird angenommen, dass die Bevorzugung von Pflanzen der Ordnung Malvales bei der Ernährung mit der Entstehung der Symbiose mit den Aktinobakterien einhergeht.

5. Zusammenfassung

Die Rekonstruktion der Phylogenie der Pyrrhocoridae auf Basis der molekularen Marker 18s-rRNA und COX1 zeigt, dass die Familie eine monophyletische Gruppe bildet. Die verschiedenen angewendeten Verfahren zur Erstellung der Stammbäume ergaben dieselben Resultate: die Gattungen *Dysdercus*, *Probergrothius* und *Pyrrhocoris* bilden jeweils eine Klade, während die Positionen von *Dindymus sp.*, *Scanthius obscurus* und *Cenaeus carnifex* durchgehend nicht komplett aufgelöst werden konnten. Unterschiede zwischen den erstellten Phylogenien sind durch geringe posterior probability- und Bootstrapwerte nur schwach unterstützt. Die Einordnung von *A. coqueberti* als Schwestergruppe von *D. cingulatus* wird als falsch angesehen. Es wird davon ausgegangen, dass anstelle der Wirts-DNA bei der Nutzung der mitochondrialen COX1-Sequenz als molekularer Marker tatsächlich die DNA der Beute *D. cingulatus* amplifiziert wurde.

Die Symbionten *Coriobacterium glomerans* und *Gordonibacter sp.*, welche vermutlich bei der Versorgung der Wanzen mit Vitaminen von Bedeutung sind, sind mit wenigen

Ausnahmen in allen untersuchten Vertretern der Pyrrhocoridae zu finden. Die untersuchten nahen verwandten Wanzenarten weisen diese jedoch nicht mehr auf. Das Auftreten der Symbionten scheint nicht geographisch bedingt, sondern auf die Aufnahme der Symbionten durch einen gemeinsamen Vorfahren der Pyrrhocoridae und eine anschließende gemeinsame Entwicklung von Symbionten und Wirt zurückzuführen zu sein. Die weitere Erforschung dieser Symbionten verspricht die Entstehung und Entwicklung der sehr spezifischen Symbiose zu verstehen.

6. Geräte und Chemikalien

Tabelle 5: Geräte

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Heizblock	BIOER	Mixing Block MB-102
Netzgerät	VWR International	Power Source 300 V
Pipetten	Eppendorf	Eppendorf Research plus 0,1–2,5 µl Eppendorf Research plus 0,5–10 µl Eppendorf Research plus 2–20 µl Eppendorf Research plus 10–100 µl Eppendorf Research plus 20–200 µl Eppendorf Research plus 100–1000 µl
Spektrophotometer	PeqLab	ND1000 photo-spectrometer
Thermocycler	Biometra	T-Professional Thermocycler Gradient 96
Tischschüttelgerät	Scientific Industries Si	Vortex Genie 2
UV-Gel-Dokumentationskammer	Syngene	G:BOX
UV-Kammer	UVP	UV2 sterilizing PCR workstation
Waage	Kern & Sohn	KERN EMB 1000-2
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific	HERAEUS Pico21 centrifuge

Tabelle 6: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol	Alfa Aesar
10x Key Buffer (MgCl ₂ 15 mM)	VWR International
dNTPs 2,0 mM	Fermentas International
Ethanol (Rotipuran)	Carl Roth
Flüssiger Stickstoff (N ₂)	
GelRed™	Biotium
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (0,1 µg/ µl)	Fermentas International
MgCl ₂ 25 mM	VWR International
SeaKem LE Agarose	Lonza
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	VWR
Pfu DNA Polymerase (2,5 U/µl)	Thermo Fisher Scientific
10x Pfu Buffer (MgSO ₄ 20 mM)	Thermo Fisher Scientific
Pfu Plus DNA Polymerase (5 U/µl)	EURx

Tabelle 7: Verwendete Kits

Verwendungszweck	Hersteller	Bezeichnung
DNA-Extraktion	Epicentre Technologies	MasterPure™ DNA Purification Kit
DNA-Aufreinigung	PeqLab	PeqGOLD MicroSpin Cycle Pure Kit

Tabelle 8: Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
6x Ladepuffer	25 mg Bromphenolblau 25 mg Xylene Cyanol 3,3 ml Glycerol 6,7 ml ddH ₂ O
1x Ladepuffer	10 ml 6x Ladepuffer 50 ml ddH ₂ O
5x TBE-Puffer (pH 8,3)	54 g Tris Base 27,5 g Borsäure 20 ml EDTA, 0,5 M Millipore-Wasser
1x TBE-Puffer	200 ml 5x TBE-Puffer 800 ml Millipore Wasser

Sonstige verwendete Materialien:

Autoklaviertes, gefiltertes Millipore Wasser

ddH₂O

Einmalhandschuhe

Gelelektrophoresekammer, Rahmen, Kämme

Glasgeräte

PCR Striptubes (VWR International)

Pipettenspitzen (Starlab)

Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)

RNase-freies Wasser

7. Quellenverzeichnis

Ahmad, I. and Schaefer, C. W. (1987). "Food plants and feeding biology of the Pyrrhocoroidea (Hemiptera)." Phytophaga **1**(1): 75-92.

Fukatsu, T. and Hosokawa, T. (2002). "Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, megacopta punctatissima." Applied and Environmental Microbiology **68**(1): 389-396.

Günther, K., Hannemann, H-J., Hieke, F., Königsmann, E., Schumann, H. (2000): Urania Tierreich Insekten. Urania Verlag Berlin

Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikon, N., Meng, X. Y., Hironaka, M. and Fukatsu, T. (2010). "Phylogenetic position and peculiar genetic traits of a midgut bacterial symbiont of the stinkbug parastrachia japonensis." Applied and Environmental Microbiology **76**(13): 4130-4135.

Huelsenbeck, J. P. and Ronquist, F. (2001). "MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees." Bioinformatics **17**(8): 754-755.

Kaltenpoth, M., Winter, S. A. and Kleinhammer, A. (2009). "Localization and transmission route of *Coriobacterium glomerans*, the endosymbiont of pyrrhocorid bugs." Fems Microbiology Ecology **69**(3): 373-383.

Kikuchi, Y., Hosokawa, T. and Fukatsu, T. (2011). "An ancient but promiscuous host-symbiont association between Burkholderia gut symbionts and their heteropteran hosts." ISME Journal **5**(3): 446-460.

Li, H. M., Deng, R. Q., Wang, J. W., Chen, Z. Y., Jia, F. L. and Wang, X. Z. (2005). "A preliminary phylogeny of the Pentatomomorpha (Hemiptera : Heteroptera) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial DNA sequences." Molecular Phylogenetics and Evolution **37**(2): 313-326.

Prado, S. S. and Almeida, R. P. P. (2009). "Phylogenetic placement of pentatomid stink bug gut symbionts." Current Microbiology **58**(1): 64-69.

Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P. (2003). "MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models." Bioinformatics **19**(12): 1572-1574.

Salem, H., Kreutzer, E. and Kaltenpoth M. "Actinobacteria as Essential Symbionts for a Cosmopolitan Cotton Pest." eingereicht

Socha, R. (1993). "PYRRHOCORIS-APTERUS (HETEROPTERA) - AN EXPERIMENTAL-MODEL SPECIES - A REVIEW." European Journal of Entomology **90**(3): 241-286.

Sudakaran, S., Salem, H., Kost, C., Kaltenpoth, M. "Geographic and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae)".eingereicht

Weirauch, C. and Schuh, R. T. (2011). Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. Annual Review of Entomology, Vol 56. Berenbaum. **56**: 487-510.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbständig verfasst und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt, nur die angegebenen Quellen benutzt und die in den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Jena, den 09.08.2012

Franziska Retz