

Molekularbiologische Analyse der genetischen Diversität des
Melitaea athalia / celadussa-Komplexes
(Lepidoptera: Nymphalidae)
unter Anwendung der ISSR-PCR
auf Art-, Unterart- und Populationsebene

Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

angefertigt im
Lehrstuhl für Spezielle Zoologie

vorgelegt von
Gerdo Achtelik

aus
Walsum

Bochum

2006

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht und dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Es handelt sich bei der heute von mir eingereichten Dissertation um fünf in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass die digitalen Abbildungen nur die originären Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Bochum, den 13.10.2006

Gerdo Achtelik

Für meine Familie

„Alle Bestrebungen des Menschen, die Ordnung der lebenden Natur zu begreifen und in einem äquivalenten Gefüge zum Ausdruck zu bringen, nehmen ihren Ausgang von Übereinstimmungen, Ähnlichkeiten und Unterschieden zwischen den Organismen“

AX, 1984

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Über Arten und Unterarten, Rassen und Ökotypen – das Phänomen <i>Melitaea athalia</i>	1
1.2 Scheckenfalter als Modellorganismen moderner Populationsforschung	4
1.3 Phylogenie der Scheckenfalter	4
1.3.1 Die Stellung im System.....	4
1.3.2 Ergebnisse phylogenetischer Forschungen	6
1.4 Fragestellungen	7
2. Material und Methoden	8
2.1 Die Untersuchungsobjekte	8
2.1.1 Nymphalinae, Melitaeini	9
2.1.1.1 <i>Melitaea athalia</i> Rottensburg, 1775	9
2.1.1.2 <i>Melitaea diamina</i> Lang 1789	11
2.1.1.3 <i>Melitaea cinxia</i> Linnaeus, 1758	12
2.1.1.4 <i>Melitaea aurelia</i> Nickerl, 1850	14
2.1.2 Heliconiinae, Argynnini	15
2.1.2.1 <i>Boloria euphrosyne</i> Linnaeus, 1758.....	16
2.1.2.2 <i>Issoria lathonia</i> Linnaeus, 1758.....	18
2.2 Herkunft des verwendeten Tiermaterials	19
2.3 Methoden.....	22
2.3.1 Mikrosatelliten (SSR).....	23
2.3.2 Amplified Length Fragment Polymorphism (AFLP).....	24
2.3.3 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	25
2.3.4 Inter Simple Sequence Repeats (ISSR).....	26
2.4 Theoretische Grundlagen der ISSR-PCR	28
2.5 ISSR-PCR in der Praxis	30
2.5.1 Behandlung des Tiermaterials.....	30
2.5.2 DNA-Extraktion	30
2.5.3 DNA-Qualitätsprüfung.....	30

2.5.4 Praktische Durchführung der ISSR-PCR	31
2.5.5 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente	35
2.5.6 Gewinnung der Basisdaten.....	38
2.6 Analyse der gewonnenen Daten.....	39
2.6.1 Genetische Diversität	39
2.6.2 Berechnung der genetischen Distanzen.....	40
2.6.2.1 Dice-Index	40
2.6.2.2 Jaccard-Index	41
2.6.2.3 Gendiversität h nach Nei (1973)	41
2.6.2.4 Shannon-Index I	42
2.6.2.5 Raup-Crick-Index.....	42
2.6.2.6 Quadrierte euklidische Distanz D	43
2.6.2.7 Fixationsindex F_{st}	43
2.6.2.8 Nm -Wert	44
2.6.3 Multivariate Statistik	45
2.6.3.1 Clusteranalyse / Dendrogramme	45
2.6.3.1.1 UPGMA	45
2.6.3.2 Hauptkoordinatenanalyse (PCO).....	45
2.6.3.3 Beziehung zwischen Cluster- und ordinativen Methoden wie der PCO.....	46
2.6.4 Varianzanalyse (AMOVA)	47
2.6.5 „Maximum Parsimony“ als Baumkonstruktionsverfahren	48
2.6.5.1 Heuristische Suchalgorithmen.....	49
2.6.5.2 Konsensusmethoden.....	51
2.6.5.3 Bewertung von Kladogrammen	51
2.6.5.3.1 Konsistenzindex CI	52
2.6.5.3.2 Homoplasieindex HI	52
2.6.5.3.3 Konservierungsindex RI	53
2.6.5.3.4 Berichtigter Konsistenzindex RC	54
2.6.5.4 „Bootstrapping“ als statistische Absicherung für MP-Verfahren	54
2.6.6 Manteltest	55
3. Ergebnisse.....	56

3.1 Einzelanalysen der Primer	56
3.1.1 Artentrennende Primer	57
3.1.1.1 Primer UBC-808	57
3.1.1.2 Primer UBC-818	59
3.1.1.3 Primer UBC-862	61
3.1.1.4 Primer UBC-865	63
3.1.1.4.1 Clusteranalyse bei UBC-865	65
3.1.1.4.2 Hauptkoordinatenanalyse bei UBC-865	67
3.1.1.4.3 Verwandtschaftsbaumkonstruktion durch „Maximum Parsimony“	69
3.1.1.4.4 Überprüfung des MP-Dendrogramms mit „Bootstrapping“	72
3.1.1.5 Primer UBC-880	74
3.1.2 Primer mit eingeschränkten Trennmöglichkeiten	76
3.1.2.1 Primer UBC-810	76
3.1.2.2 Primer UBC-868	78
3.1.2.3 Primer UBC-878	80
3.1.2.4 Primer UBC-884	82
3.2 Gesamtanalyse anhand der Daten von mehreren Primern	84
3.2.1 Interspezifische ISSR-Untersuchungen bei fünf Nymphaliden-Arten	84
3.2.1.1 UPGMA-Clusteranalyse auf der Basis verschiedener Distanzmaße	85
3.2.1.2 Hauptkoordinatenanalyse (PCO)	91
3.2.1.3 Stammbaumrekonstruktion durch das „Maximum-Parsimony“-Verfahren	96
3.2.1.4 „Bootstrapping“ als Prüfmethode für das MP-Kladogramm	98
3.2.2 Intraspezifische Diversität bei <i>Melitaea athalia</i>	100
3.2.2.1 UPGMA-Clusteranalyse auf der Basis verschiedener Distanzmaße	103
3.2.2.2 Hauptkoordinatenanalyse (PCO)	108
3.2.2.3 Verwandtschaftsbaumrekonstruktion durch „Maximum-Parsimony“	114
3.2.2.4 Genetische Variation zwischen Fundorten, Populationen und Regionen	117
3.2.2.4.1 AMOVA von 14 Einzelfundorten ohne Berücksichtigung der räumlichen Nähe	117
3.2.2.4.2 AMOVA der zu 8 Regionen zusammengefassten Fundorte	118
3.2.2.4.3 UPGMA-Clusteranalyse auf Basis errechneter F_{st} -Werte	118
3.2.2.4.4 AMOVA innerhalb und zwischen den 3 Hauptregionen	119

3.2.2.4.5 Weitere AMOVA-Untersuchungen.....	120
3.2.2.4.6 Genfluß zwischen den Populationen	122
3.2.2.4.7 Korrelation zwischen genetischer und geographischer Distanz.....	122
4. Diskussion	124
4.1 Einleitung	124
4.2 Genetische Marker	124
4.3 Differenzierung und Beziehungen zwischen <i>Melitaea athalia</i> -Populationen.....	126
4.4 Die Gefährdungssituation von <i>Melitaea athalia</i>	132
4.5 Taxonomische Konsequenzen.....	133
5. Zusammenfassung.....	135
6. Literaturverzeichnis.....	137
7. Abkürzungen und Symbole	157
8. Anhang.....	161
8.1 Material	161
8.1.1 Chemikalien	161
8.1.2 Eingesetzte Lösungen und Puffer.....	161
8.1.3 DNA-Längenstandard	162
8.1.4 Enzyme.....	162
8.1.5 Primer	162
8.1.6 Kits	162
8.1.7 Geräte	162
8.1.8 Verbrauchsmaterialien, Laborbedarf.....	163
9. Danksagung	164
10. Lebenslauf.....	166

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Zone des Aufeinandertreffens der beiden Taxa „ <i>athalia</i> “ und „ <i>celadussa</i> “ in Mitteleuropa	3
Abb. 2.1: <i>Melitaea athalia athalia</i> Rottenburg 1775 und <i>M. athalia celadussa</i> Fruhstorfer 1910	9
Abb. 2.2: Verbreitungskarte von <i>Melitaea athalia</i> (Gesamtverbreitung aller Taxa dieser Art)	10
Abb. 2.3: <i>Melitaea diamina</i> Lang 1789	11
Abb. 2.4: Verbreitungskarte von <i>Melitaea diamina</i>	12
Abb. 2.5: <i>Melitaea cinxia</i> Linnaeus 1758	13
Abb. 2.6: Verbreitungskarte von <i>Melitaea cinxia</i>	14
Abb. 2.7: <i>Melitaea aurelia</i> Nickerl 1850	14
Abb. 2.8: Verbreitungskarte von <i>Melitaea aurelia</i>	15
Abb. 2.9: <i>Boloria euphrosyne</i> Linnaeus 1758.....	16
Abb. 2.10: Verbreitungskarte von <i>Boloria euphrosyne</i>	17
Abb. 2.11: <i>Issoria lathonia</i> Linnaeus 1758.....	18
Abb. 2.12 Verbreitungskarte von <i>Issoria lathonia</i>	18
Abb. 2.13: Schematischer Ablauf einer ISSR-PCR	29
Abb. 2.14: Beispiel für ein Bandenmuster, welches mit Primer UBC-865 erhalten wurde.....	37
Abb. 2.15: Beispiel für ein hochpolymorphes Bandenmuster, welches mit Primer UBC-855 erhalten wurde.	38
Abb. 3.1: UPGMA-Dendrogramm für den Primer UBC-865 auf Basis des Dice-Index.....	66
Abb. 3.2: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse für Primer UBC-865 nach Dice	67
Abb. 3.3: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse für Primer UBC-865 nach Raup-Crick	68
Abb. 3.4: Strikter Konsensusbaum der „Maximum Parsimony“-Analyse der Datenmatrix des Primers UBC-865.....	70
Abb. 3.5: „50 %-majority-rule“-Konsensusbaum der „Maximum Parsimony“-Analyse der Datenmatrix des Primers UBC-865.....	71
Abb. 3.6: „Maximum Parsimony bootstrap“-Analyse der durch den Primer UBC-865 erhaltenen Datenmatrix.....	73

Abb. 3.7: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Analyse der Loci der 5 Nymphaliden-Arten, die bei Anwendung von 8 ISSR-Primern erhalten wurden.	85
Abb. 3.8: UPGMA-Dendrogramm mit 5 Nymphaliden-Arten, basierend auf dem Dice-Index, der mit 8 Primern ermittelt wurde.	87
Abb. 3.9: UPGMA-Dendrogramm mit 5 Nymphaliden-Arten, basierend auf dem Jaccard-Index, der mit 8 Primern ermittelt wurde.	88
Abb. 3.10: UPGMA-Dendrogramm mit 5 Nymphaliden-Arten, basierend auf dem Raup-Crick-Index, der mit 8 Primern ermittelt wurde.	89
Abb. 3.11: Verhältnis der durchschnittlichen Indizes nach Dice, Jaccard und Raup-Crick bei 5 Nymphaliden-Arten.	90
Abb. 3.12: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 1 und 2) auf Basis des Dice-Index.	91
Abb. 3.13: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 2 und 3) auf Basis des Dice -Index.	92
Abb. 3.14: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse auf Basis des Jaccard-Index:	93
Abb. 3.15: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 1 und 2) auf Basis des Raup-Crick-Index.	94
Abb. 3.16: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 2 und 3) auf Basis des Raup-Crick -Index	95
Abb. 3.17: „Strikter Konsensusbaum“ der „Maximum Parsimony“-Analyse der Datenmatrix von 5 Nymphaliden-Arten, gewonnen von 8 ISSR-Primern.	97
Abb. 3.18: Kladogramm der „Maximum Parsimony Bootstrap“-Analyse der Datenmatrix von 5 Nymphaliden-Arten, gewonnen von 8 ISSR-Primern.	99
Abb. 3.19: Untersuchte Regionen der <i>M. athalia</i> -Populationen in Europa	101
Abb. 3.20: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Analyse der Loci der 8 <i>M. athalia</i> -Populationen, die bei Anwendung von 8 ISSR-Primern erhalten wurden.	103
Abb. 3.21: UPGMA-Dendrogramm von 100 Individuen aus 8 <i>M. athalia</i> Populationen, basierend auf dem Dice-Index, der mit 8 Primern ermittelt wurde.	105
Abb. 3.22: UPGMA-Dendrogramm von 100 Individuen aus 8 <i>M. athalia</i> -Populationen, basierend auf dem Jaccard-Index, der mit 8 Primern ermittelt wurde.	106

Abb. 3.23: UPGMA-Dendrogramm von 100 Individuen aus 8 <i>M. athalia</i> -Populationen, basierend auf dem Raup-Crick-Index, der mit 8 Primern ermittelt wurde	107
Abb. 3.24: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 1 und 2) auf Basis des Dice-Index.....	109
Abb. 3.25: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 2 und 3) auf Basis des Dice-Index.....	110
Abb. 3.26: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse auf Basis des Jaccard – Index.....	111
Abb. 3.27: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 1 und 2) auf Basis des Raup-Crick-Index.....	112
Abb. 3.28: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 2 und 3) auf Basis des Raup-Crick-Index.....	113
Abb. 3.29: „50%-majority-rule-Baum“ der „Maximum Parsimony“-Analyse der Datenmatrix von 100 Individuen von <i>M. athalia</i> aus 8 Regionen, auf Basis der Marker von 8 ISSR-Primern.	115
Abb. 3.30: „Strict-consensus-Baum“ der „Maximum Parsimony“-Analyse der Datenmatrix von 100 Individuen von <i>M. athalia</i> aus 8 Regionen, auf Basis der Marker von 8 ISSR-Primern.	116
Abb. 3.31: UPGMA-Clusteranalyse für 8 Regionen auf Basis von der vom AMOVA-Programm errechneten F_{st} -Werte	119

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Fundortangaben zu den untersuchten <i>M. athalia</i> -Populationen.....	20
Tab. 2.2: Fundortangaben zu den untersuchten <i>M. aurelia</i> -Stichproben	20
Tab. 2.3: Fundortangaben zu den untersuchten <i>M. cinxia</i> -Stichproben.....	21
Tab. 2.4: Fundortangaben zu den untersuchten <i>M. diamina</i> -Stichproben.....	21
Tab. 2.5: Fundortangaben zu den untersuchten <i>B. euphrosyne</i> -Stichproben	21
Tab. 2.6: Fundortangaben zu den untersuchten <i>I. lathonia</i> -Stichproben	22
Tab. 2.7: Auflistung der bei einem Screening für die ISSR-PCR bei Melitaeini erfolgreich getesteten Primer.	33
Tab. 2.8: Darstellung des standardmäßig verwendeten PCR-Temperaturprofils.....	34
Tab. 3.1: Primer mit Arten- aber ohne Populationsunterscheidung	56
Tab. 3.2: Primer mit geringer Arten- , aber (partieller) Populationsunterscheidung	56
Tab. 3.3: Primer ohne Arten- und ohne Populationsunterscheidung	56
Tab. 3.4: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-808	58
Tab. 3.5: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-818	60
Tab. 3.6: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-862	62
Tab. 3.7: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-865	64
Tab. 3.8: Eigenwerte und Varianzen der Hauptkomponentenanalyse auf Basis der Ähnlichkeitsindizes nach Dice und Raup-Crick bei Primer UBC-865	69
Tab. 3.9: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-880	75
Tab. 3.10: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-810	77
Tab. 3.11: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-868	79
Tab. 3.12: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-878	81
Tab. 3.13: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-884	83
Tab. 3.14: Auswertung der Loci, die von 8 ISSR-Primern für 5 Nymphalidentaxa gewonnen werden konnten.	85
Tab. 3.15: Indizes nach Dice, Jaccard und Raup-Crick für alle komplett untersuchten Individuen der 5 Arten.....	90
Tab. 3.16: Eigenwerte 1-4, die mittels der Hauptkoordinatenanalysen auf Basis von 3 Ähnlichkeitsindizes errechnet wurden.	96

Tab. 3.17: Auswertung der Loci, die von 8 ISSR-Primern für 8 <i>M. athalia</i> -Populationen gewonnen werden konnten.....	102
Tab. 3.18: Eigenwerte und Varianzen der für 8 <i>M. athalia</i> -Populationen durchgeführten Hauptkoordinatenanalysen.....	113
Tab. 3.19: AMOVA der 14 Fundorte von <i>M. athalia</i>	117
Tab. 3.20: AMOVA der zu 8 Regionen zusammengefassten Fundorte von <i>M. athalia</i>	118
Tab. 3.21: Matrix der F_{st} Werte für 8 Regionen.....	118
Tab. 3.22: AMOVA der 3 Hauptregionen von <i>M. athalia</i>	120
Tab. 3.23: Ergebnisse der Varianzanalysen (AMOVA) zwischen der „Nord“-Gruppe und 4 anderen Populationen von <i>M. athalia</i>	121
Tab. 3.24: Ergebnisse der Varianzanalysen (AMOVA) zwischen der Polnischen, Walliser, Südtiroler und Südfranzösisch-Ligurischen Population.....	121
Tab. 3.25: Matrix der Nm -Werte, die auf Basis der F_{st} -Werte berechnet wurden.	122
Tab. 3.26: Matrix der geographischen Distanzen zwischen 8 Populationen. Die Zahlen geben die Abstände in Kilometer Luftlinie wieder.....	123
Tab. 4.1: AMOVA-Analyse auf Basis der klassischen Nord/Süd-Unterscheidung (resp. <i>M. athalia/celadussa</i>).....	127

1. Einleitung

1.1 Über Arten und Unterarten, Rassen und Ökotypen – das Phänomen *Melitaea athalia*

Kaum eine weitere palaearktisch verbreitete Schmetterlingsart hat seit fast einem Jahrhundert die Lepidopterologen so sehr fasziniert wie der „Wachtelweizen-Scheckenfalter“ *Melitaea athalia* Rottemburg 1775. Das liegt zum einen daran, dass allein die Unterscheidung dieser Art von ihren Verwandten *M. aurelia* Nickerl 1850, *M. britomartis* Assmann 1847, *M. deione* Geyer 1832, *M. parthenoides* Keferstein 1851, *M. varia* Meyer-Dür 1851 und *M. diamina* Lang 1798 so schwierig ist, dass eine sichere Bestimmung oftmals nur nach Untersuchung des Genitalapparates möglich ist (Ebert & Rennwald 1991, Settele et al. 1999, Weidemann 1995), zum anderen ist die Variationsbreite innerhalb der Art so groß, dass bis heute keine absolute Klarheit darüber herrscht, ob es unter dem Taxon *M. athalia* nicht kryptische Arten gibt (Tolman & Lewington 1998).

Erst als der Wert der männlichen Genitalstrukturen für die Unterscheidung „schwieriger“ Schmetterlingsarten erkannt wurde, erhielt die Scheckenfalterforschung ihre Dynamik. Dampf (1910) veröffentlichte die erste Arbeit auf Basis von Genitaluntersuchungen und bildete die Strukturen der Arten *M. athalia*, *M. deione*, *M. aurelia* und *M. parthenie* Borkhausen (heute: *M. varia* Meyer-Dür 1851) ab. Es folgten Hormuzaki (1911), der *M. athalia* und *M. aurelia* in der Bukowina miteinander verglich, Suschkin (1913) u. a. mit der Abbildung des Genitalapparates von *M. britomartis* sowie Sheldon (1916). Reverdin (1920) entdeckte als erster die Unterschiede im männlichen Genital zwischen nördlichen und südwestlichen Formen von *M. athalia* und beschrieb die südwestliche Form als eigene Art: *Melitaea pseudathalia*. 1922 analysierte Reverdin seine Entdeckung in einer ausführlicheren Arbeit und legte die Verbreitung der beiden Taxa detailliert dar. Da schon Reverdin selbst, aber auch andere Autoren wie Beuret (1931), Rocci (1932) und Higgins (1932) von zahlreichen Tieren berichteten, die intermediäre Merkmale aufwiesen, wurde schon früh von einer Hybridzone zweier Taxa gesprochen. Beuret (1933) untersuchte die Präimaginalstadien beider Taxa und stellte zahlreiche Unterschiede fest. Gleichzeitig unternahm er Hybridisierungsversuche, die allerdings fehlschlügen, was gleichzeitig einen Rückschlag für die Theorie bedeutete, dass die bekannte

Mischzone durch einfache Hybridisierung zustande kommt. Verity (1940) analysierte die Gesamtverbreitungssituation von *M. athalia* am genauesten: Auf Basis der Genitalstrukturen ordnete er 53 *athalia*-Populationen 3 Sektionen zu: Sektion I *helvetica* Rühl (= *pseudathalia* Reverdin = *celadussa* Fruhstorfer), Sektion II intermediäre Formen, Sektion III *athalia* (Rottemburg). 1953 veröffentlichte Bourgonne seine Untersuchungsergebnisse zur Situation der Übergangszone zwischen *M. athalia athalia* und *M. athalia celadussa* Fruhstorfer 1910 (= *pseudathalia* Reverdin) in Frankreich. In Abb 1.1 ist die Kontaktzone der Taxa „*athalia*“ und „*celadussa*“ dargestellt. Das breite ökologische Spektrum und die hohe morphologische Variabilität hat bei *M. athalia* zur Beschreibung einer Vielzahl von „Formen“ geführt. Je nach Autor wird bei einigen bis heute ein Artstatus vermutet. Dazu zählen die Taxa „*veronicae* Dorfmeister 1853“, „*suessula* Fruhstorfer 1910“, „*centroposita* Issekutz & Kovacz 1954“ und die als „Torfwiesen-*athalia*“ bekannt gewordene *Melitaea neglecta* Pfau 1962 (Pfau 1962, Marschner 1981, Kristal 1987, Schadewald 1988). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch gezielt nach Populationen von *M. neglecta* (in Mecklenburg-Vorpommern) und „*suessula*“ (in Bayern, Rohrseemoos am Kochelsee) gesucht. Leider blieb trotz intensiver Nachforschung der Erfolg aus, so dass diese Taxa nicht in die Untersuchungen miteinbezogen werden konnten.

Die taxonomisch unübersichtliche Situation, wie man sie bei *M. athalia* vorfindet, hat Wissenschaftler veranlasst, nach Begriffen zu suchen, die solche Phänomene beschreiben, die nichts anderes als evolutionäre Prozesszustände sind. Hierzu gehören Begriffe wie „Dualspezies“, „Schwesternarten“, „Superspezies“, „Komplexarten“ und „Ökotypen“; in älterer Literatur spricht man in solchen Fällen gerne von „Rassen“ und „Varietäten“.



Abb. 1.1: Zone des Aufeinandertreffens der beiden Taxa „athalia“ und „celadussa“ in Mitteleuropa

Die nach Studien von Higgins (1932), Verity (1940) und Bourgogne (1953) vermutete Kontaktzone ist rot eingefärbt, wobei die Situation in Nordspanien unklar ist. Die Ausdehnung des Kontaktbereichs scheint von Gebiet zu Gebiet unterschiedlich zu sein (nach Higgins 150-200 km), genaue Angaben fehlen.

1.2 Scheckenfalter als Modellorganismen moderner Populationsforschung

Inzwischen haben Schmetterlinge breite Anwendung als Modellsysteme für ökologische Studien und für die Erforschung evolutiver Vorgänge in natürlichen Populationen gefunden (Boggs et al. 2003, Watt & Boggs 2003). Sie sind aufgrund ihrer Sensibilität hinsichtlich veränderter Umweltbedingungen, ihrer kurzen Generationsfolge und wegen des außergewöhnlich guten Wissens über ihre Biologie hierfür besonders geeignet. Aktuell laufen zwei Langzeitprojekte, bei denen Scheckenfalter die entscheidende Rolle als Modellsysteme für die Erforschung der Populations- und Metapopulationsbiologie spielen: Seit über 40 Jahren wird von Ehrlich et al. an der Stanford-University, Stanford, Kalifornien, das „*Euphydryas-editha*-Projekt“ durchgeführt, welches sich mit vielen Fragen der Populationsbiologie befasst, wie Populationsdynamik (z.B. Ehrlich 1965, 1984, Ehrlich et al. 1980, Ehrlich & Mason 1966, Singer & Ehrlich 1979), Populationsregulation (Ehrlich & Murphy 1981b), ökologische Zusammenhänge wie Futterpflanzen- (z.B. Ehrlich & Raven 1964, Singer 1971a, 1971b, 1984) und Parasitenbeziehungen, aber auch Fragen um das biologische Artkonzept (Ehrlich 1961, Ehrlich & White 1980), Biodiversität (Ehrlich 1992, Ehrlich & Wilson 1991), Phylogenetik (Ehrlich 1958) und Taxonomie (Ehrlich & Murphy 1981a, Ehrlich 1983). Dagegen stehen bei Hanski et al., Universität Helsinki, seit mehr als 15 Jahren Fragen um die Metapopulationsbiologie im Vordergrund. Hier dient die Art *Melitaea cinxia* als Modellorganismus (z.B. Hanski 2003, Hanski et al. 1994, Hanski et al. 1995, Hanski & Singer 2001, Ehrlich & Hanski 2004). In Großbritannien steht *M. athalia* aufgrund dramatischer Populationsverluste im Fokus des Interesses. Warren untersuchte in einer Serie von Veröffentlichungen Fragen der Ökologie und Populationsbiologie, um letztendlich Strategien zur Rettung der letzten Bestände auf den Britischen Inseln zu entwickeln (Warren 1987a, 1987b, 1987c, 1991).

1.3 Phylogenie der Scheckenfalter

1.3.1 Die Stellung im System

Die untersuchten Schecken- und Perlmutterfalterarten gehören alle zu den Tagfaltern (Papilionoidea) und sind sämtlich Angehörige der Familie Nymphalidae („Edelfalter“). Die Nymphalidae umfassen mit schätzungsweise 6000 Arten (Ackery 1984) weltweit etwa ein Drittel aller Tagfalter. Es zählen kleine bis sehr große Arten dazu mit einer beträchtlichen

Variationsbreite hinsichtlich Färbung und Flügelzeichnung. Auch die Biologie ist sehr unterschiedlich. Meist werden die Eier in Gruppen abgelegt. Die jüngeren Larven leben dann gesellig und schützen sich durch den Bau von Nestern. Die Unterteilung der Nymphalidae in Unterfamilien wurde zuerst von Ehrlich (1958) diskutiert. Harvey veröffentlichte (in Nijhout 1991) eine Revision der Familie. Scoble (1992) führt 13 Unterfamilien für die Nymphalidae auf, darunter die Nymphalinae und Heliconiinae.

Obwohl es zweifelsfrei viele natürliche Gruppen innerhalb der Unterfamilie Nymphalinae gibt, so gilt sie ebenso sicher als nicht monophyletisch (Ackery 1984, DeVries et al. 1985). Etwa die Hälfte der Nymphalidae, ca. 3000 Arten, werden in dieser Unterfamilie zusammengefasst (Ackery 1984). Sie sind weltweit verbreitet. Charakteristisch ist die Reduzierung der Vorderbeine in beiden Geschlechtern. Die Raupen tragen häufig Dornen oder Dornenkegel. Zahlreiche Wanderfalter zählen zu den Nymphalinae, wie z.B. der Distelfalter *Vanessa cardui* Linnaeus 1758 oder der Admiral *Vanessa atalanta* Linnaeus 1758.

Die als Außengruppe zu den Scheckenfaltern in die Untersuchungen einbezogenen Perlmutterfalter gelten als monophyletische Gruppe und werden als Tribus Argynnini innerhalb der Unterfamilie Heliconiinae zusammengefasst. Die Heliconiinae wurden von Ehrlich (1958) noch den Nymphalinae zugeordnet. Ackery (1984) führt sie trotz Bedenken als eigene Unterfamilie. In Europa sind die einzigen Mitglieder dieser Unterfamilie die sog. Perlmutterfalter (englisch: „fritillaries“), kleine bis größere, kräftige Falter mit orangeroter Grundfärbung und schwarzen Strich- und Fleckenzeichnungen. Die Arten zeichnen sich durch bunte Hinterflügelunterseiten aus, die häufig auffallende permuttartige Flecken aufweisen (Name!). Im Gegensatz zu den Melitaeini legen die Argynnini ihre Eier meist einzeln ab, wobei Violaceae als Futterpflanzen der Raupen bevorzugt werden.

Der Tribus Melitaeini umfasst etwa 270 Schmetterlingsarten, der innerhalb der Unterfamilie Nymphalinae (sensu Harvey 1991) eine in sich geschlossene Gruppe bildet. In der deutschsprachigen Literatur werden diese Schmetterlinge als „Scheckenfalter“ bezeichnet (englisch: „checkerspots“). Die Falter zeichnen sich durch einen einheitlichen Habitus in Größe und Färbung aus. Auch die Lebensweise ist sehr ähnlich: Die Falter legen ihre Eier in Form von Gelegen ab. Bevorzugte Futterpflanzen sind Scrophulariaceae und Plantaginaceae, daneben Valerianaceae. Die Raupen überwintern meist nach der 3. oder 4. Häutung und zerstreuen sich im Frühjahr. Dabei kommt es nicht selten zum Wechsel der Futterpflanzen. Die Puppenruhe dauert

witterungsabhängig etwa 4 Wochen. Die meisten Arten fliegen in den Sommermonaten Juni und Juli.

1.3.2 Ergebnisse phylogenetischer Forschungen

Die unabhängige Analyse verschiedener Daten, sowohl morphologischer (Kons 2000) als auch molekularer Art (Wahlberg & Zimmermann 2000, Zimmermann et al. 2000, Wahlberg unveröffentlichte Daten) weisen den Tribus Melitaeini als monophyletische Gruppe aus. Die bereits vom Britischen Entomologen Higgins (1978, 1981) getroffene Unterscheidung der Scheckenfalter in die drei Gruppen Euphydrina, Melitaeina und Phyciodina wurde später durch Wahlberg und Zimmermann (2000) bestätigt, die diesen Gruppen den Status als drei Subtribi zustanden. Die Beziehungen zwischen den drei Subtribi wurden mit Hilfe morphologischer Methoden (Kons 2000), durch die Untersuchung mitochondrialer DNA-Sequenzen (Wahlberg & Zimmermann 2000, Zimmermann et al. 2000) und die Analyse von zwei nukleären DNA-Sequenzen von verschiedenen Chromosomen („EF-1 α “ und „wingless“) (Wahlberg in Ehrlich & Hanski 2004) untersucht. Die phylogenetische Analyse positioniert die Euphydrina übereinstimmend als ursprünglichste Scheckenfaltergruppe, allerdings widersprechen sich die verschiedenen methodischen Ansätze hinsichtlich der Beziehungen innerhalb und zwischen den beiden anderen Subtribi. Des weiteren sprechen die Analysen dafür, das der Subtribus Melitaeina in zwei Gruppen aufgespalten werden sollte: die Melitaeina mit der palaearktischen Gattung *Melitaea* sowie die Chlosynina mit den Gattungen des amerikanischen Kontinents (*Chlosyne*, *Microtia*, *Texola*, *Dymasia* und *Poladryas*).

Da die zitierten Untersuchungen Ergebnisse für die Phylogenetik auf Art-, Gattungs-, oder Familienniveau liefern, müssen für Analysen auf Populationsebene andere Methoden benutzt werden. Ein vergleichsweise neuer Ansatz, molekulare Marker zu gewinnen, ist die ISSR-Methode (Zietkiewicz et al. 1994). Die Abkürzung ISSR steht für „Inter Simple Sequence Repeats“. Hierbei werden PCR-Primer benutzt, die direkt zu den Sequenzen von invers angeordneten Mikrosatelliten komplementär sind. Da die Methode in der Pflanzenforschung mehrfach erfolgreich eingesetzt worden ist, andererseits nur sehr wenige Erfahrungen bei Lepidopteren (bei Seidenspinnern: u.a. Chatterjee et al. 2004, Chatterjee & Mohandas 2003, Reddy et al. 1999) vorlagen, bot sich die ISSR-PCR als interessantes und vielversprechendes Verfahren zur Analyse des *M. athalia* / *celadussa*-Komplexes an.

1.4 Fragestellungen

Aufgrund der beschriebenen Vorteile wurde die ISSR-Methode ausgewählt, um folgende Fragen rund um den *Melitaea-athalia* / *celadussa*-Komplex zu beantworten:

- Ist die ISSR-PCR methodisch geeignet, Populationen von *Melitaea athalia* sowie verwandte Nymphaliden-Arten voneinander zu trennen?
- Wie sehen die genetische Zusammensetzung und die Struktur verschiedener Populationen von *M. athalia* aus?
- Gibt es homogene Populationen?
- In welchem Zusammenhang stehen die Populationen zueinander? Gibt es klare Trennungen oder gibt es Brückenpopulationen, welche die geographisch entferntesten Populationen miteinander verbinden?
- Gibt es artspezifische und / oder populationspezifische Marker?
- Wird die Unterteilung in die Taxa *Melitaea athalia athalia* und *Melitaea athalia celadussa* durch die molekularen Marker gestützt?
- Stützen oder widersprechen sich die Ergebnisse der Berechnungen verschiedener Diversitätsindizes und unterschiedlicher Analysemethoden wie UPGMA-Clusterverfahren, Hauptkoordinatenanalysen, AMOVA („Analysis of Molecular Variance“) und „Maximum Parsimony“-Verfahren?
- Können mit Hilfe des „Maximum Parsimony“-Verfahrens phylogenetische Zusammenhänge erkannt werden?
- Sind aus den Ergebnissen taxonomische Konsequenzen zu ziehen?
- Wie ist die Gefährdungssituation aufgrund der erzielten Ergebnisse (mögliche genetische Isolierung) einzuschätzen?

2. Material und Methoden

2.1 Die Untersuchungsobjekte

Um die Ergebnisse innerhalb des *M. athalia* / *celadussa*-Komplexes vergleichen und bewerten zu können, wurden drei weitere *Melitaea*- sowie zwei Perlmutterfalterarten – letztere als Angehörige der Argynnini – in die Untersuchungen miteinbezogen. Diese Arten stehen somit als „Außengruppen“ zu Verfügung. Die Auswahl der zusätzlichen Scheckenfalterarten stellt sicher, dass zum einen sehr nah verwandte und schon rein optisch ähnliche Tiere wie *M. aurelia* und *M. diamina* untersucht werden, gleichzeitig mit *M. cinxia* ein vom Habitus und Flugverhalten ein eher ungewöhnliches Mitglied der Gattung *Melitaea* berücksichtigt wird. Die Perlmutterfalter *Issoria lathonia* und *Boloria euphrosyne* gehören zu verschiedenen Gattungen im Tribus Argynnini innerhalb der Heliconiinae. Sie sind Beispiele für verwandte Angehörige eines separaten, monophyletischen und den Melitaeini nahestehenden Tribus.

2.1.1 Nymphalinae, Melitaeini

2.1.1.1 *Melitaea athalia* Rottemburg, 1775



Abb. 2.1: *Melitaea athalia athalia* Rottemburg 1775 und *M. athalia celadussa* Fruhstorfer 1910

1. Reihe: *M. athalia athalia*, Oberseite; Fundortangaben ♂: „Bayern, Oberstdorf, 11.7.1979, 800 m, leg. G. Achtelik“
Fundortangaben ♀: „Bayern, Oberstdorf, 20.7.1979, 800 m, leg. G. Achtelik“.

2. Reihe: Unterseite der Falter aus Reihe 1.

3. Reihe: *M. athalia celadussa*, Oberseite. Fundortangaben ♂ und ♀: „Schweiz, Tessin, Val Lavizzara, Fusio, 1300 m, 8.8.81“

4. Reihe: Unterseite der Falter aus Reihe 3. Alle Falter befinden sich in coll. Gerdo Achtelik.

Der Wachtelweizen-Schneckenfalter *Melitaea athalia* ist in ganz Europa verbreitet. Östlich erstreckt sich sein Gebiet bis Japan. In Europa werden zwei unterschiedliche Gruppen unterschieden: Die typische „*athalia*“ Rottemburg 1775 und die auf der Iberischen Halbinsel, in Italien, Teilen Südwestfrankreichs und südlich des Alpenhauptkammes fliegende „*celadussa*“

Fruhstorfer 1910, die insbesondere auf Grund von Unterschieden in der Morphologie des männlichen Genitalapparates abgetrennt wurde. In einem 150-200 km breiten Streifen („Kontaktzone“) weisen die Falter mehr oder weniger stark ausgeprägte Zwischenformen auf. Die folgenden Verbreitungskarten sind unter Zuhilfenahme der Daten-CD *Lepibase 2.0* (Roine 2000) erstellt worden und wurden je nach Datenlage aktualisiert und bearbeitet. Dabei sind die bekannten Verbreitungsgebiete schwarz eingefärbt.

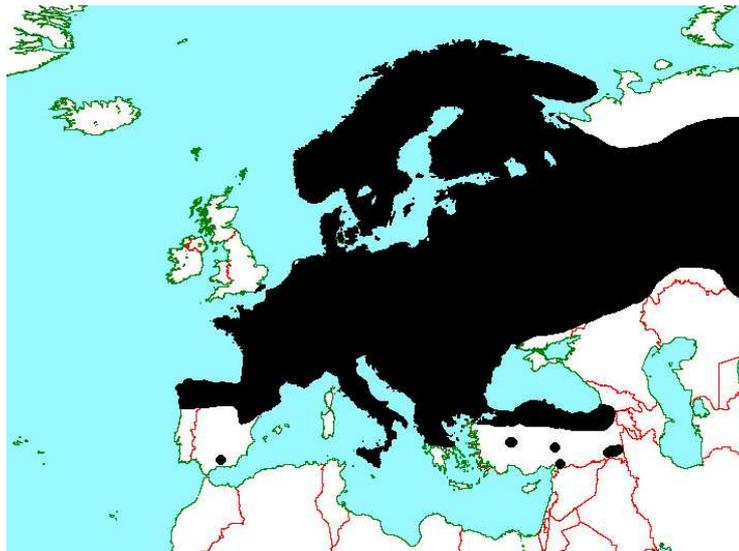


Abb. 2.2: Verbreitungskarte von *Melitaea athalia* (Gesamtverbreitung aller Taxa dieser Art)

M. athalia bildet eine Generation im Jahr aus und fliegt von Juni bis Ende Juli. In südlichen Verbreitungsgebieten kann es zu einer zweiten Generation im August / September kommen. Der Falter bevorzugt frische bis feuchte Wiesen. Hier kann er sympatrisch mit *M. diamina* vorkommen. In Brandenburg findet man ihn mit seinen Futterpflanzen *Melampyrum* und *Veronica* in lichten Kiefernwäldern. *M. athalia* ist äußerst variabel und neigt je nach Biotop zu unterschiedlichen phänetischen Ausprägungen, die häufig Anlass für Namensgebungen waren. Die Weibchen legen die Eier in Gelegen von etwa 50 Stück ab. Hauptfutterpflanzen sind Spitzwegerich (*Plantago lanceolata*), Wiesen-Wachtelweizen (*Melampyrum pratense*) sowie Ehrenpreis (*Veronica spicata*). Die anfangs gemeinsam in einem dünnen Gespinst lebenden Raupen vereinzeln sich bereits im 2. Larvalstadium (Wahlberg 2000). Im 4. Stadium überwintern die Raupen angesponnen unter dürren Blättern. Die Puppenphase dauert etwa 3 Wochen. Weitere Details finden sich bei Wahlberg (1997a) und Selonen (1997).

2.1.1.2 *Melitaea diamina* Lang 1789

Melitaea diamina ist in seiner Nominatform ein sehr dunkler Scheckenfalter, der bevorzugt feuchte Lebensräume besiedelt. Dabei ist er an das Vorkommen seiner Futterpflanze Baldrian (*Valeriana spec.*) gebunden, die ihm auch seinen deutschen Namen gegeben hat: „Baldrian-Scheckenfalter“. *M. diamina* hat meist nur eine Generation im Jahr und fliegt in Abhängigkeit von der Höhenlage von Mai bis Juli. An warmen Standorten, besonders im südlichen Verbreitungsgebiet, kann es zu einer 2. Generation von August bis September kommen. Die Eier werden in Form von meist nur einem Gelege auf der Unterseite der Blätter der Futterpflanze angeheftet. Dabei umfassen die Gelege durchschnittlich etwa 100 Eier. Die gemeinschaftlich lebenden Raupen überwintern im 4. Larvenstadium locker eingesponnen in kleineren Gruppen unter dünnen Blättern in der Nähe der Futterpflanze und vereinzeln sich im Frühjahr. Eine ausführliche Beschreibung des Lebenszyklus von *M. diamina* findet sich bei Wahlberg (1997b).



Abb. 2.3: *Melitaea diamina* Lang 1789

1. Reihe: Oberseite, 2. Reihe Unterseite. Fundortangabe ♂: „Schweiz, Graubünden, unterh. vom Albulapass, 1700 m, 15.7.1991, leg. G. Achtelik“. Fundortangabe ♀: „Deutschland, Baden-Württemberg, Schwäbische Alb, Hayingen, 90/11, e. o., 20.5.1991, leg. I. Achtelik.“ Die Falter befinden sich in coll. Gerdo Achtelik.

Die Verbreitung von *Melitaea diamina* erstreckt sich vom Norden der Iberischen Halbinsel durch die klimatisch gemäßigte Zone über Russland, Sibirien, Transbaikal, Amur-Gebiet und die Mongolei bis nach Nordostchina, Korea und Japan. Die Nord-Süd-Ausdehnung dieses Areal reicht in Europa vom südlichen Fennoskandien bis in den Norden der Balkanhalbinsel. In Westfrankreich und Süditalien (Kampanien, Abruzzen) existieren isolierte Vorkommen (Ebert & Rennwald 1991, Volpe et al. 2005), außerdem gibt es Kolonien im Nordosten der Türkei (Hesselbarth et al. 1995). Auf den Britischen Inseln fehlt die Art.

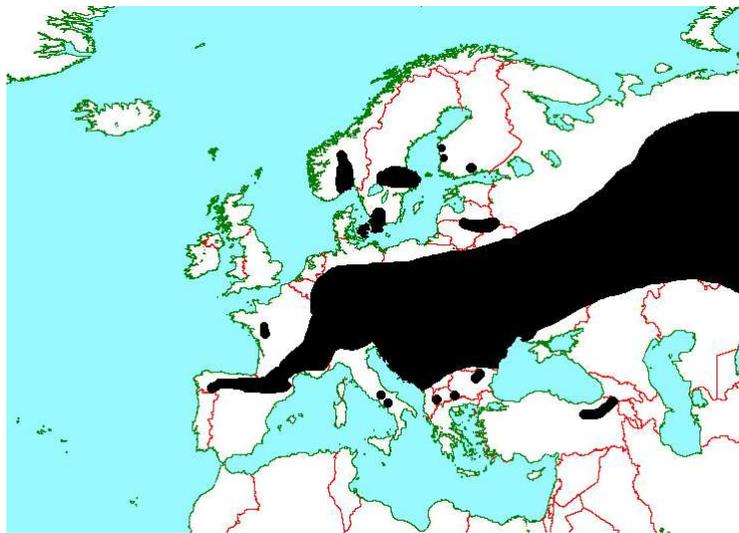


Abb. 2.4: Verbreitungskarte von *Melitaea diamina*

2.1.1.3 *Melitaea cinxia* Linnaeus, 1758

Melitaea cinxia kommt besonders an trockenen Standorten vor, obgleich auch Populationen von feuchten Standorten wie Moorkomplexen bekannt sind (Ebert & Rennwald 1991). Ich selbst habe den Falter nur in trockenen und sehr warmen Lebensräumen gefunden. Er ist im Gegensatz zu fast allen anderen Angehörigen der Gattung *Melitaea* ein schneller und guter Flieger. Im Freiland ist er gut von seinen Verwandten zu unterscheiden: Keine andere einheimische Scheckenfalterart besitzt so auffällige schwarze Punkte auf der inneren Randbinde der Hinterflügel.

In Mitteleuropa bildet die Art von Anfang April bis August eine Generation aus, während in den Südalpen und im Mittelmeerraum zwei Generationen (Mai-Juni, August-September) auftreten können. Die Weibchen legen ihre Eier in großen Gelegen ab, im Durchschnitt etwa 170 Stück

(Wahlberg 1995). Diese können auch übereinandergeschichtet werden. Die Raupe überwintert im 4. oder 5. Larvalstadium, wobei nicht jede Raupe ein 5. Larvalstadium vor der Überwinterung ausbildet. Nach der Überwinterung häuten sich die Raupen noch zweimal, so dass die Raupen letztlich ihre Entwicklung mit 6 oder 7 Häutungen abschließen (Wahlberg 2000).



Abb. 2.5: *Melitaea cinxia* Linnaeus 1758

1. Reihe: Oberseite, 2. Reihe Unterseite. Fundortangabe ♂: „BR Deutschland, Baden-Württembg., Bad Säckingen, 25.5.1987, e. l., leg. G. Achtelik“. Fundortangabe ♀: „Südfrankreich, Digne u. U., 8.8.82, leg. G. Achtelik.“ Die Falter befinden sich in coll. Gerdo Achtelik.

Die Raupen spinnen vom ersten Tag an große Netze, die die ganze Futterpflanze bedecken können und unter denen sie auch gemeinsam überwintern. Die wichtigste Futterpflanze ist Spitzwegerich (*Plantago lanceolata*, Plantaginaceae), was dem Falter auch seinen deutschen Namen eingebracht hat: Wegerich-Scheckenfalter. Daneben wird auch Ehrenpreis (*Veronica spicata*, Scrophulariaceae) als Eiablage- und Futterpflanze beobachtet (Kuussari et al. 1995).

Melitaea cinxia ist von Südwesteuropa durch die klimatisch gemäßigte Zone bis Ostasien (Amur-Gebiet, China) verbreitet. Die Nord-Süd-Verbreitung reicht vom südlichen Fennoskandien bis Sizilien. Im Hohen Atlas existiert eine isolierte Population. Die Art fehlt im Süden der Iberischen Halbinsel, auf fast allen Mittelmeerinseln sowie in Großbritannien mit Ausnahme eines isolierten Vorkommens an der Südküste Englands. Die Vorkommen in Marokko beschränken sich auf den Hohen (2000-2600 m) sowie Mittleren Atlas (1500-2000 m).

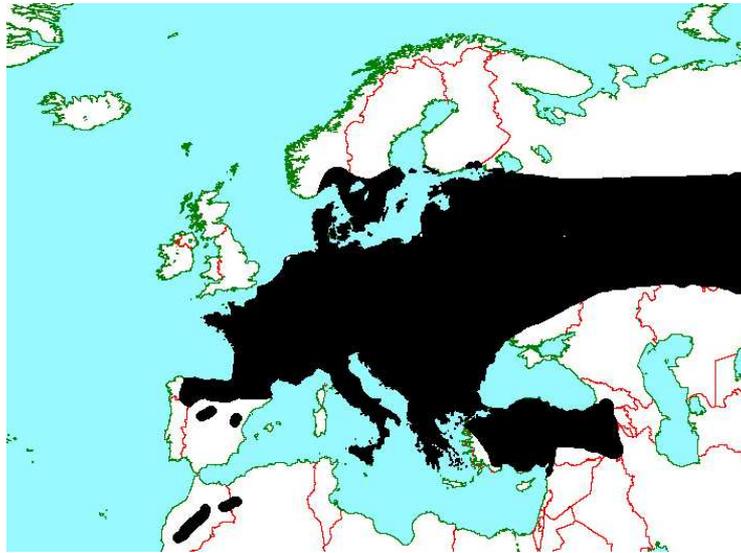


Abb. 2.6: Verbreitungskarte von *Melitaea cinxia*

2.1.1.4 *Melitaea aurelia* Nickerl, 1850

Melitaea aurelia besiedelt bevorzugt gebüschreiche Mager- und Trockenrasen. Die Art gehört zu den Scheckenfaltern, die im Gelände wegen ihrer großen Ähnlichkeit zu *M. britomartis* und *M. athalia* nur schwer korrekt identifizierbar sind.

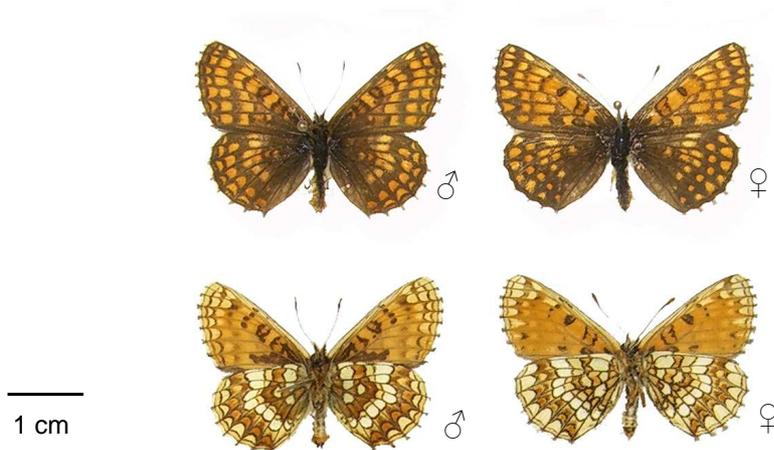


Abb. 2.7: *Melitaea aurelia* Nickerl 1850

1. Reihe: Oberseite, 2. Reihe Unterseite. Fundortangabe ♂ und ♀: „D / Nordhessen, Hess. Lichtenau, 25.6.1998.“ Die Falter befinden sich in coll. Gerdo Achteulik.

Der Falter fliegt nur in einer Generation im wesentlichen von Mitte Juni bis Mitte Juli und legt seine Eier bevorzugt in gelblichen Gelegen durchaus auch in mehreren Schichten an der Blattunterseite von Wegerich-Arten sowie Ehrenpreis ab. Das Verhalten, die Entwicklung und die Färbung der Raupen ähneln stark denen von *M. athalia*. Die Raupen überwintern im 4. Larvalstadium leicht angesponnen in zusammengerollten Blättern. Die Puppenruhe dauert etwa drei Wochen.

Melitaea aurelia findet sich in Mittel- und Osteuropa bis zum Balkan. Im Westen dehnt sich das Areal bis Nordfrankreich (Umgebung von Paris) aus und zieht sich über Deutschland, Schweiz und Norditalien bis zum Po. In Skandinavien ist ein Vorkommen von Südschweden (Petersen 1945) bekannt. Nach Higgins (1955) gibt es Nachweise aus Zentral-Russland bis zum Ural. Im Mittelmeerraum, auf der Iberischen Halbinsel und auf den Britischen Inseln fehlt die Art.

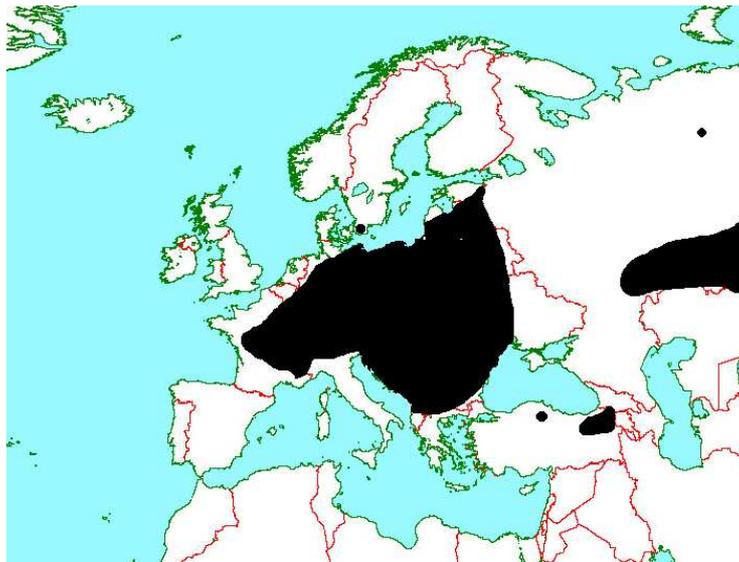


Abb. 2.8: Verbreitungskarte von *Melitaea aurelia*

2.1.2 Heliconiinae, Argynnini

Mitglieder der als monophyletisch geltenden Gruppe der Argynnini werden in dieser Arbeit als Außengruppe(n) auf Artniveau genutzt. Einige Arten ähneln vom Habitus den Melitaeini, so dass der ungeübte Beobachter im Feld durchaus auch beide Gruppen verwechseln kann.

2.1.2.1 *Boloria euphrosyne* Linnaeus, 1758

Boloria euphrosyne erscheint schon Ende April, die Flugzeit endet in der Regel im Juni, im Gebirge im Juli. Nur selten kommt es zu einer 2. Generation. Die gelblichen Eier werden einzeln an Blattunterseiten von Veilchenarten wie *Viola hirta* oder *Viola canina* abgelegt. *B. euphrosyne* fliegt gerne im Bereich von Waldrändern in meist niedrigen Populationsdichten. Die Raupe überwintert halberwachsen im vierten Kleid (L₄). Die braune Stürzpuppe hat in der Regel kleine Silberflecken und ist in der Bodenvegetation zu finden.

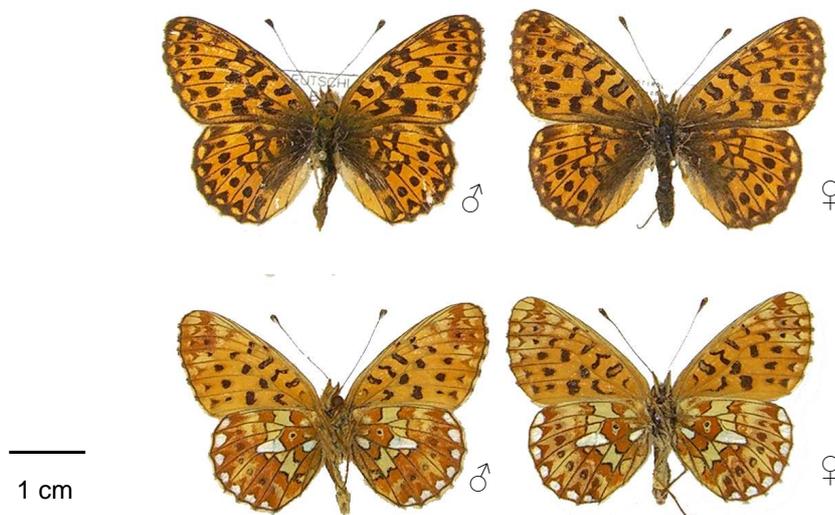


Abb. 2.9: *Boloria euphrosyne* Linnaeus 1758

1. Reihe: Oberseite, 2. Reihe Unterseite. Fundortangabe ♂: „Deutschland, Bayern, Berchtesgadener Land, Scharitzkehlalm, 1200 m, 12.6.1990, leg. G. Achtelik“, Fundortangabe ♀: „Südtirol, Villnösstal, Teis, 900 m, 17.7.80, leg. G. Achtelik.“ Die Falter befinden sich in coll. Gerdo Achtelik.

Die Verbreitung des Silberfleck-Perlmutterfalters *Boloria euphrosyne* erstreckt sich von den Britischen Inseln durch ganz Europa bis Ostasien (Kamtschatka). Mit Ausnahme des Nordwestens fehlt der Falter auf der Iberischen Halbinsel auf dem Peloponnes und den Mittelmeerinseln mit Ausnahme Siziliens.

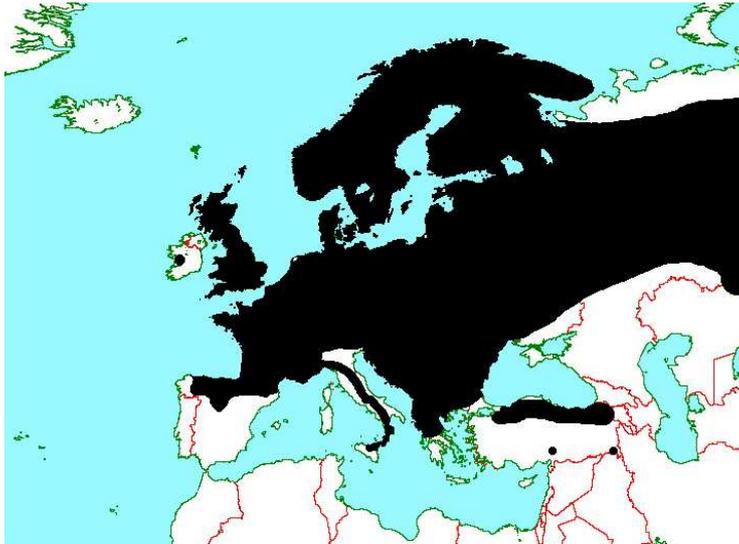


Abb. 2.10: Verbreitungskarte von *Boloria euphrosyne*

2.1.2.2 *Issoria lathonia* Linnaeus, 1758

Der Kleine Perlmutterfalter *Issoria lathonia* ist in ganz Europa mit Ausnahme der Britischen Insel und des nördlichen Fennoskandien verbreitet. Seine östliche Verbreitung reicht bis Mittelasien. Durch die großen Silberflecke auf der Hinterflügelunterseite ist der Falter unverwechselbar.



Abb. 2.11: *Issoria lathonia* Linnaeus 1758

1. Reihe: Oberseite, 2. Reihe Unterseite. Fundortangabe ♂: "Italia, Provinz Imperia, C. S. Bartholomeo, 620 m, 22.VII.1981, leg. G. Achtelik." Fundortangabe ♀: "Jugoslawien, vic. Bitola, Pelister, 1600 m, 18.7.1981, Arnscheid". Die Falter befinden sich in coll. Gerdo Achtelik.

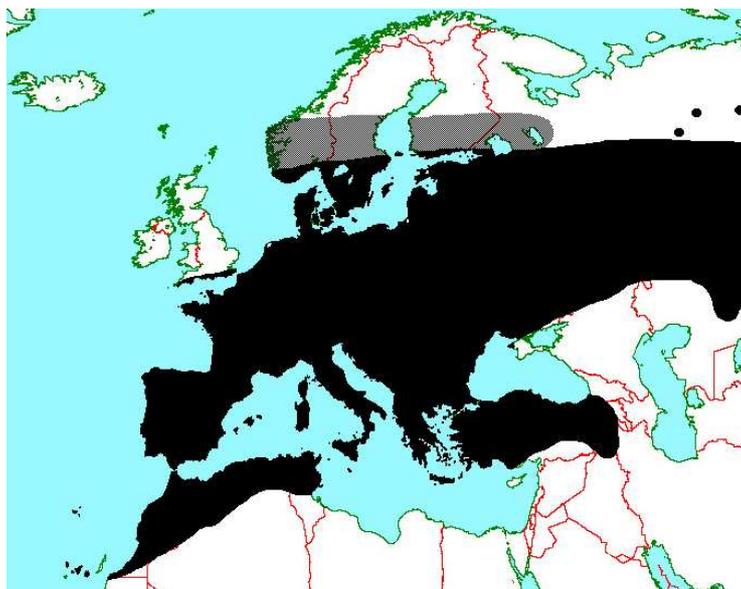


Abb. 2.12 Verbreitungskarte von *Issoria lathonia*

I. lathonia bevorzugt offene Flächen im Kulturland wie abgemähte Getreidefelder, Brachland und Ruderalflächen. Starke Populationen finden sich auch in Dünengebieten, z. B. auf der Nordseeinsel Langeoog (eigene Beobachtungen). Die Generationenfolge ist unklar, der Falter kann je nach Witterungsverlauf mehrere Generationen im Jahr ausbilden. Dabei ist er auf Vorkommen des Stiefmütterchens (*Viola tricolor*, *Viola arvensis*), seiner Raupenfutterpflanze, angewiesen, auf der die Eier einzeln an die Blattunterseiten abgelegt werden. Es konnten überwinterte Raupen und Puppen festgestellt werden. Je nach Umgebung beginnt die Flugzeit Mitte März und endet im Oktober. Die drastischen Bestandseinbußen, die diese Art in Mitteleuropa erlitten hat, hängen unmittelbar mit Veränderungen der landwirtschaftlichen Nutzung zusammen (Ebert & Rennwald 1991). Die Art ist als ausgeprägter Wanderfalter bekannt. So erklären sich auch die Vorkommen auf Madeira und den Kanaren und bis 66° N in Skandinavien (s. Abb. 2.12: grau gefärbter Bereich: nur gelegentliches Vorkommen aufgrund von Zuwanderung).

2.2 Herkunft des verwendeten Tiermaterials

Das Tiermaterial für die diversen Untersuchungen wurde über mehrere Jahre hinweg im Verlauf von Exkursionen zu vermuteten Populationen von *Melitaea athalia* fast ausschließlich vom Autor gesammelt. Hierbei waren aufgrund der nicht immer günstigen Wetterverhältnisse, der nicht sehr ausgedehnten Flugzeit - bei nur einer Generation im Jahr beträgt die Hauptflugzeit etwa 14 Tage - sowie der jahrweise schwankenden Erscheinungszeit der Falter auch etliche Rückschläge zu verzeichnen. So führte durchaus nicht jede sorgfältig geplante Exkursion auch zum Auffinden der Schmetterlinge. Schwerpunktmäßig interessierte der Alpenraum, weil in diesem Gebiet die beiden Taxa *M. athalia athalia* und *M. athalia celadussa* aufeinandertreffen.

Ingesamt wurde Material von 28 Fundorten in die molekularbiologische Untersuchung einbezogen. Dabei entfielen auf den *M. athalia / celadussa*-Komplex 21 Populationen aus 8 Regionen. Die anderen Nymphalidentaxa wurden – auch aufgrund geringer Stückzahlen - nicht nach Populationen oder Regionen getrennt ausgewertet. Tabelle 2.1 gibt die exakten Fundortdaten der untersuchten *M. athalia / celadussa*-Populationen wieder, die Tabellen 2.2 – 2.6 die exakten Fundortdaten der anderen Nymphalidenarten, die in dieser Studie eine Rolle spielen:

M. diamina, *M. aurelia*, *M. cinxia*, *B. euphrosyne* und *I. lathonia*.

Tab. 2.1: Fundortangaben zu den untersuchten *M. athalia*-Populationen

Kürzel	Staat	Verwaltungs- ebene	Region	Ortsangabe	Höhe	Nördl. Breite	Östl. Länge
ODkle	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) (OT Klein Wall)	39m	52°25'	13°49'
ODfic	Deutschland	Sachsen	Erzgebirge	Oberwiesenthal Fichtelberg	1214 m	50° 25,15'	12° 56,38'
WDirS	Deutschland	Rheinland- Pfalz	Eifel	Daleiden NSG Irsental	452m	50°4'	6°10'
Flsip	Finnland	Helsinki	35km nördl. Helsinki	Sipoo	35m	60°10'	24°56'
PLbia	Polen	Podlasien	Kreis Hajnowka	NP Bialowieża	150m	52°40'	23°50'
VBfra	Österreich	Vorarlberg	Rätikon	Frastanz (OT Bazora)	1050m	47°11,4'	9°37,2'
VBame	Österreich	Vorarlberg	Rätikon	Frastanz- Amerlügen	788m	47°12,6'	9°36,6'
VBssb	Österreich	Vorarlberg	Gr. Walsertal	Sonntag- (Seefeld)- Buchboden	850m	47°14,4'	9° 57,12'
Llgaf	Liechtenstein	Vaduz		Triesenberg (unterhalb Gaflei)	1200m	47°08'	9°33'
CHind	Schweiz	Wallis	Leuk, Dalatal	Inden	1138m	46°21' 0''	7°37' 0''
CHloe	Schweiz	Wallis	Lötschental	Blatten	1542m	46°25'	7°49'
STafe	Italien	Südtirol	Aferertal	St. Georg in Afers	1510m	46°40,3'	11° 41,7'
STstp	Italien	Südtirol	Villnößtal	St. Peter/Villnöß	1150m	46°38,4'	11°41'
STstj	Italien	Südtirol	Villnößtal	St. Jakob „Moarhof“	1320m	46°39,5'	11° 39,5'
STpfo	Italien	Südtirol	Pfossental	Vorderkaser (Hof)	1658m	46°44'	10° 54,3'
STtei	Italien	Südtirol	Villnößtal	Teis	963m	46°39, 4'	11° 37,5'
LGroj	Italien	Ligurien	Rojatal	Colle Langan	1167m	43°58,1'	7°43,6'
SFluz	Frankreich	Alpes Maritimes		Lucéram	665m	43°52'	7°21,6'
SFpei	Frankreich	Alpes Maritimes		Peira-Cava	1500m	43°55,8'	7°21,6'
SFstm	Frankreich	Alpes Maritimes		St. Martin Vésubié	970m	44°4'	7°15'
SFten	Frankreich	Alpes Maritimes		Tende	825m	44°4,8'	7°36'

Tab. 2.2: Fundortangaben zu den untersuchten *M. aurelia*-Stichproben

Kürzel	Staat	Verwaltungs- ebene	Region	Ortsangabe	Höhe	Nördl. Breite	Östl. Länge
aureWD226	Deutschland	Rheinld.-Pfalz	Eifel	Weinsheim	560m	50°23,3'	6°46,6'
aureWD227	Deutschland	Rheinld.-Pfalz	Eifel	Weinsheim	560m	50°23,3'	6°46,6'
aureWD228	Deutschland	Rheinld.-Pfalz	Eifel	Weinsheim	560m	50°23,3'	6°46,6'
aureWD229	Deutschland	Rheinld.-Pfalz	Eifel	Weinsheim	560m	50°23,3'	6°46,6'

Tab. 2.3: Fundortangaben zu den untersuchten *M. cinxia*-Stichproben

Kürzel (Individuen)	Staat	Verwaltungsebene	Region	Ortsangabe	Höhe	Nördl. Breite	Östl. Länge
cinxOD163	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) Kienbaum	39m	52° 27'	13° 57'
cinxOD267	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) Kienbaum	39m	52° 27'	13° 57'
cinxOD268	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) Kienbaum	39m	52° 27'	13° 57'
cinxOD269	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) Kienbaum	39m	52° 27'	13° 57'

Tab. 2.4: Fundortangaben zu den untersuchten *M. diamina*-Stichproben

Kürzel (Individuen)	Staat	Verwaltungsebene	Region	Ortsangabe	Höhe	Nördl. Breite	Östl. Länge
diamOD164	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) Kienbaum	39m	52° 27'	13° 57'
diamOD270	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) Kienbaum	39m	52° 27'	13° 57'
diamOD271	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) Kienbaum	39m	52° 27'	13° 57'
diamOD272	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) Kienbaum	39m	52° 27'	13° 57'
diamOD273	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) Kienbaum	39m	52° 27'	13° 57'
diamOD274	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) Kienbaum	39m	52° 27'	13° 57'
diamOD275	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) Kienbaum	39m	52° 27'	13° 57'
diamOD276	Deutschland	Brandenburg	Oder-Spree	Grünheide(Mark) Kienbaum	39m	52° 27'	13° 57'
diamST277	Italien	Südtirol	Pfossental	Vorderkaser (Hof)	1658m	46° 44'	10° 54,3'
diamST278	Italien	Südtirol	Pfossental	Vorderkaser (Hof)	1658m	46° 44'	10° 54,3'
diamST331	Italien	Südtirol	Pfossental	Vorderkaser (Hof)	1658m	46° 44'	10° 54,3'
diamBA503	Deutschland	Bayern	Alpenvorland	Kochelsee	600m	47° 39'	11° 21'
diamBA504	Deutschland	Bayern	Alpenvorland	Kochelsee	600m	47° 39'	11° 21'
diamBA505	Deutschland	Bayern	Alpenvorland	Kochelsee	600m	47° 39'	11° 21'

Tab. 2.5: Fundortangaben zu den untersuchten *B. euphrosyne*-Stichproben

Kürzel (Individuen)	Staat	Verwaltungsebene	Region	Ortsangabe	Höhe	Nördl. Breite	Östl. Länge
euphrSF511	Frankreich	Alpes Maritimes		Col de Turini	1604m	43° 58,6'	7° 23,5'
euphrCH515	Schweiz	Glarus	Klöntal	oberhlab. Riedern	650m	47° 2'	9° 3'
euphrST512	Italien	Südtirol	Martelltal	oberhalb Morter	1200m	46° 34,2'	10° 47,6'
euphrST513	Italien	Südtirol	Sarnthal	Sarnthein	1255m	46° 38,3'	11° 20,9'
euphrST514	Italien	Südtirol	Villnößtal	St. Jakob „Moarhof“	1320m	46° 39,5'	11° 39,5'

Tab. 2.6: Fundortangaben zu den untersuchten *I. lathonia*-Stichproben

Kürzel (Individuen)	Staat	Verwaltungsebene	Region	Ortsangabe	Höhe	Nördl. Breite	Östl. Länge
lathSF509	Frankreich	Alpes Maritimes		Col de Turini	1604m	43° 58,6'	7° 23,5'
lathSF510	Frankreich	Alpes Maritimes		Col de Turini	1604m	43° 58,6'	7° 23,5'
lathST506	Italien	Südtirol	Villnößtal	Teis	963m	46° 39,4'	11° 37,5'
lathST507	Italien	Südtirol	Villnößtal	Teis	963m	46° 39,4'	11° 37,5'
lathST508	Italien	Südtirol	Villnößtal	Teis	963m	46° 39,4'	11° 37,5'

2.3 Methoden

Grundsätzlich stehen zur Erforschung der phylogenetischen Beziehungen zwischen Organismen verschiedene methodische Möglichkeiten zur Verfügung: Morphologische Untersuchungen führten ursprünglich zur Entdeckung der Unterschiede im männlichen Genital von *M. athalia*. Immer noch werden neue *Melitaea*-Arten aufgrund morphologischer Untersuchungen entdeckt (Achtelik 1999). Sie haben den Vorteil, dass sie sich problemlos auch an getrocknetem und präpariertem Tiermaterial durchführen lassen, wie es in Sammlungen zu finden ist. In den letzten Jahren wurden zunehmend molekularbiologische Techniken verwendet, um die genetische Diversität von Arten und Populationen zu untersuchen. Zu Beginn der achtziger Jahre gewann die Allozymelektrophorese große Bedeutung. Allozyme sind die am weitesten verbreiteten Proteinmarker und werden im Allgemeinen auf Stärke- und Polyacrylamidgelen sowie auf Celluloseacetatfolien getrennt. Die Detektion erfolgt mit Hilfe enzyspezifischer Reaktionsmischungen. Mit ihrer Hilfe kann man prüfen, „ob die Proteine eines Locus in ihrer Aminosäuresequenz identisch sind, oder ob Punktmutationen in einem der Allele vorkommen, die man durch Trennung der Elektromorphen nachweisen kann“ (Storch et al. 2001). Auch bei Schreckenfallern sind Allozymelektrophoresen durchgeführt worden (u. a. Britten et al. 1995, Brussard et al. 1985, Brussard et al. 1989, Pelz 1995, Porter & Mueller 1998, Vawter & Brussard 1975, eigene Untersuchungen) und auch heute noch liefert diese Methode wertvolle Erkenntnisse. Inzwischen stehen zunehmend Methoden im Fokus des Interesses, die die DNA direkt untersuchen können (Avice 1994), wie die Untersuchung mitochondrialer DNA-Sequenzen (Wahlberg & Zimmermann 2000, Zimmermann et al. 2000) oder nukleärer DNA-Sequenzen („EF-1 α “ und „wingless“: Wahlberg in Ehrlich & Hanski 2004) zeigen. Die Ergebnisse dieser Analysen beziehen sich in erster Linie auf die phylogenetischen Beziehungen zwischen den Arten, Gattungen und Tribi.

Molekulare Marker, mit deren Hilfe die genetische Variabilität auf der Populationsebene erforscht werden kann (Wolfe & Liston 1998), werden insbesondere mit folgenden PCR-basierten Methoden gewonnen: die Mikrosatelliten-Methode (SSR – „simple sequence repeat“), die RAPD-Methode („random amplified polymorphic DNA“) und die AFLP-Methode („amplified fragment length polymorphism“). Obwohl diese Methoden eine weite Verbreitung gefunden haben, so haben sie auch Nachteile; im Folgenden sollen diese Methoden kurz charakterisiert werden.

2.3.1 Mikrosatelliten (SSR)

Mikrosatelliten sind genetische Marker aus dem nichtkodierenden Bereich des Genoms, in dem keine Gene, also keine Bauanleitungen für Proteine gespeichert sind. In bestimmten Abschnitten dieses Bereichs gibt es repetitive Sequenzen der DNA-Bausteine, bei denen kurze Motive („Repeats“) wie z. B. CG oder GAAT mehrfach hintereinander auf dem DNA-Strang wiederholt werden. Die Zahl der Wiederholungen variiert zwischen Individuen relativ häufig, so dass mehrere Varianten dieser Abschnitte in einer Population vorkommen. Diese Abschnitte werden Mikrosatelliten genannt und können durch die PCR-Methode aus der genomischen DNA gezielt millionenfach vermehrt und mittels Elektrophorese getrennt und sichtbar gemacht werden. Die Kombination aus mehreren dieser genetischen Marker ergibt ein individuelles Muster, das ähnlich wie ein Strichcode oder eine Zahlenkolonne dargestellt werden kann. Bei der Vererbung wird das spezifische Mikrosatelliten-Muster an die Nachkommen weiter gegeben. Aus diesem Grund werden Mikrosatelliten seit langem als DNA-Marker für Vaterschaftstests verwendet. In der Pflanzengenetik sind Mikrosatelliten wegen ihrer kodominanten Vererbung zur Sortendifferenzierung beliebt.

Der Vorteil der Mikrosatelliten-PCR, nur Nanogramm-Mengen an DNA zu benötigen und somit sehr empfindlich zu sein, wird durch den Nachteil, eigene spezifische Primer entwickeln zu müssen, oft zunichte gemacht. Trotz eines hohen Zeit- und Kostenaufwandes ist die Isolierung und Charakterisierung vom Mikrosatelliten bei den Lepidopteren schwieriger als bei den meisten anderen Organismen (Megléc & Solignac 1998, Keygobadi et al. 1999, Nève & Megléc 2000, Megléc et al. 2004). So sind bis heute nur wenige Mikrosatellitenloci von Schmetterlingen bekannt geworden (z. B. Palo et al. 1995, Bogdanowicz et al. 1997, Megléc & Solignac 1998, Keygobadi et al. 1999, Harper et al. 2000, Anthony et al. 2001, Caldas et al. 2002, Cassel 2002,

Flanagan et al. 2002, Amsellem et al. 2003, Ji et al. 2003, Megléc et al. 2004), wobei die Anzahl der isolierten Mikrosatelliten mit zwei Ausnahmen, dem Seidenspinner *Bombyx mori* (Reddy et al. 1999) und der Papilionidenart *Parnassius smintheus* (Keyghobadi et al. 2002) fünf oder weniger betrug.

Gründe hierfür könnten in Duplizierungs- oder Vervielfältigungsereignissen liegen, die größere Bereiche oder Minisatellitenregionen beeinflussen, die Mikrosatelliten enthalten. Dabei könnte die Multiplikation von Mikrosatelliten an mobile Elemente gebunden sein. Darüber hinaus kann „crossing over“ zwischen nicht homologen Mikrosatelliten zum Austausch der flankierenden Regionen zwischen den Mikrosatelliten führen. Diese Phänomene scheinen bei anderen Insekten wie z. B. bei *Aphis fabae* (Hemiptera) im Gegensatz zu Lepidopteren nicht vorzukommen (Megléc et al. 2004).

2.3.2 Amplified Length Fragment Polymorphism (AFLP)

Die AFLP-Methode (Vos et al. 1995) basiert auf der selektiven Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch die PCR. Dabei wird im ersten Schritt die gesamtgenomische DNA mit zwei Restriktionsendonukleasen gespalten. Nachfolgend werden an die Enden der so entstandenen Fragmente spezifische Adapter ligiert. Die Sequenzen dieser Adapter und der jeweiligen Restriktionsschnittstelle dienen dann in einer anschließenden PCR als Bindungsstelle für verschiedene AFLP-Primer. Diese Primer unterscheiden sich in der Anzahl selektiver Nukleotide an ihrem 3'-Ende, so dass nur ein Teil der Restriktionsfragmente in der PCR amplifiziert wird. So kann über das Design der Primer die Komplexität des zu erwartenden Bandenmusters beeinflusst werden. Im letzten Schritt einer AFLP-Analyse werden die radioaktiv oder fluoreszierend markierten PCR-Produkte auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Autoradiographie oder Sequenzierautomaten detektiert. Meist wird die AFLP bei pflanzlichen (Sharma et al. 1996, Pakniyat et al. 1997), pilzlichen (Majer et al. 1996) und bakteriellen (Janssen et al. 1996) Genomen angewandt. Anwendungsbeispiele sind die Kartierung von Pflanzengenomen („mapping“) und Vaterschaftsanalysen. In der Zoologie gibt es noch relativ wenige Erfahrungen (Besch & Akesson 2005, Wang et al. 2003). Dennoch gibt es auch innerhalb der Entomologie Beispiele für den erfolgreichen Einsatz der AFLP-Methode: 1998 benutzte Reineke AFLP (neben RAPD) zur Differenzierung verschiedener Populationen des Schwammspinners, *Lymantria dispar* (Lepidoptera, Lymantriidae). Heckel et al. (1998) untersuchten Resistenzen der Nacht-

faltergattungen *Heliothis* und *Helicoverpa* gegenüber chemischen und biologischen Insektiziden mit Hilfe der AFLP-Methode. Kryptische Heuschreckenarten konnten ebenso mittels AFLP unterschieden werden (Parson & Shaw 2001) wie die Nordamerikanischen Bläulingstaxa *Lycaeides melissa melissa* und *L. melissa samuelis* (Gompert et al. 2006).

Der Vorteil der AFLP-Methode liegt darin, dass sie ohne Kenntnis von Nukleotidsequenzen im Genom durchgeführt werden kann und zu einem hochpolymorphen Bandenmuster führt, welches in der Regel gut reproduzierbar ist. Allerdings kommt es bei einer unübersichtlichen Zahl von Fragmenten schnell zu Auswertungsproblemen. Daher kann es für AFLP-Analysen komplexer Genome sinnvoll sein, „die Anzahl detektierter AFLP-Fragmente durch die Wahl geeigneter Primerkombinationen zu beschränken“ (Reineke 1998). Bei den Versuchsbedingungen ist strikt darauf zu achten, dass der Verdau der genomischen DNA mit Restriktionsenzymen vollständig verläuft. Vor allem im hochmolekularen Bereich des AFLP-Gels können partiell gespaltene Fragmente als zusätzliche Banden detektiert werden und stellen somit „falsche Polymorphismen“ zwischen verschiedenen Individuen dar (Lin & Kuo 1995). Daneben gilt die AFLP-Methode als arbeitsintensiv und ist mit vergleichsweise hohen Kosten verbunden (Karp et al. 1997, Bornet & Branchard 2001).

2.3.3 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Die Technik der RAPD (Williams et al. 1990) detektiert genetische Variationen ohne Kenntnis der Ziel-DNA-Sequenzen. Mit Hilfe eines einzelnen kurzen „Zufallsprimers“ werden DNA-Regionen amplifiziert, die sich zwischen zwei in geeigneten Abständen (etwa 3000 bp) auf komplementären Strängen liegenden Primerbindungsstellen befinden.

Polymorphismen resultieren aus Variationen in der Anzahl passender Primerbindungsstellen und werden nach gelelektrophoretischer Analyse der Amplifikationsprodukte (Banden) anhand der Ab- bzw. Anwesenheit bestimmter Fragmente detektiert. Die wesentlichen Vorteile dieser Technik liegen in der einfachen Anwendbarkeit, der schnellen Bereitstellung genetischer Informationen sowie einem geringen DNA Bedarf. Problematisch ist, dass die Marker häufig nicht genug Variabilität zeigen und insbesondere oft nicht reproduzierbar genug sind (Ellingsworth et al. 1993, Meunier & Grimont 1993, Micheli et al. 1994, Wolfe und Liston 1998). Das hängt in erster Linie mit den Primern zusammen, die nur eine Länge von ca. 10 Nukleotiden aufweisen. Das Ergebnis wird so leicht von der Menge der an der Reaktion beteiligten Parameter beeinflusst (Menge der Template-DNA und/ oder der PCR-Primer, die

gewählten Temperaturprogramme und Enzyme). Es handelt sich um dominante Marker, so dass nicht zwischen heterozygoten und homozygoten Individuen unterschieden werden kann (Carlson et al. 1991, Hadrys et al. 1992). Außerdem ist praktisch unmöglich, die Homologie von RAPD Fragmenten festzustellen, die von Individuen stammen, deren Beziehung nicht bekannt ist (Weeden et al. 1992). Somit ist keine Entscheidung darüber möglich, ob die getrennten Banden auf einem Gel von dem gleichen Locus stammen (Rollison & Stothard 1994). Dennoch ist die Methode auch in der Entomologie weit verbreitet und bei Lepidopteren angewendet worden, wie z. B. bei der Unterscheidung verschiedener Populationen des Schwammspinners *Lymantria dispar* (Lep., Lymantriidae) (Garner & Slavicek 1996, Reineke 1998), der Noctuide *Spodoptera frugiperda* (Martinelli et al. 2006) sowie zur Differenzierung verschiedener Subspezies und Hybridzonen der Nymphalide *Oleria onega* in Peru (Galusser et al. 2004).

2.3.4 Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)

Ein vergleichsweise neuer Ansatz, molekulare Marker zu gewinnen, ist die ISSR-Methode (Zietkiewicz et al. 1994). Die Abkürzung ISSR steht für „Inter Simple Sequence Repeats“. Hierbei handelt es sich um einen Spezialfall der Mikrosatelliten-PCR, bei dem PCR-Primer benutzt werden, die direkt zu den Sequenzen von Mikrosatelliten komplementär sind. Liegen zwei Mikrosatelliten in Nachbarschaft (Abstand nach eigenen Untersuchungen 100-4000 bp), von denen einer durch Inversion seine Orientierung geändert hat, erhält man PCR-Produkte, die oft Polymorphismen zwischen Taxa klar erkennen lassen. Jeder Primer besteht aus Di- oder Trinukleotidwiederholungen mit ein bis drei zusätzlichen Nukleotiden am 5' oder 3' Ende, die als Anker dienen (Gupta et al. 1994; Zietkiewicz et al. 1994), um die Selektivität der Amplifizierungsreaktionen zu erhöhen. Zwingend erforderlich sind solche Anker jedoch nicht. Auch in dieser Untersuchung sind durchaus auch Primer ohne Anker mit Erfolg verwendet worden. Identische Wiederholungssequenzen mit unterschiedlichen Ankersequenzen können unterschiedliche Bandenmuster ergeben (Wolfe et al. 1998). Ebenso wie die RAPD-Marker werden auch die ISSR-Marker als dominante Marker analysiert (Wolfe and Liston 1998). Gemeinsam ist beiden Methoden auch, dass nur ein einziger Primer eingesetzt wird. Da dieser Primer jedoch bei der ISSR-Methode 16-20 bp lang ist, erreicht die ISSR-PCR die notwendige Selektivität und Reproduzierbarkeit.

Der Vorteil der ISSR-Methode liegt somit in der kostengünstigen und leichten Anwendung,

verbunden mit einer bis zu drei- bis fünffach größeren Variabilität als bei den RAPD-Markern (Meekins et al. 2001). Auch ist es – wie bei der RAPD-Methode – nicht nötig, vorherige Kenntnisse über das Genom zu besitzen, welches analysiert werden soll. Bisheriger Schwerpunkt für den Einsatz der ISSR ist die Pflanzenforschung. Das betrifft systematische, molekulare, ökologische Bereiche, dazu Studien zur Ertragssteigerungen bei Nutzpflanzen, auf Populationsebene ebenso wie zwischen nahe verwandten Arten (Tsumura et al. 1996; Hollingsworth et al. 1998, Esselmann et al. 1999). Einen wichtigen Anwendungsbereich hat die ISSR-PCR in der Erforschung des intraspezifischen Polymorphismus diverser Pflanzen gefunden, wie z. B. bei Zitrus (*Poncirus trifoliata*) (Fang et al. 1997), Erdnuss (*Arachis hypogaea*) (Raina et al. 2001), Hopfen (*Humulus lupulus*) (Patzak 2001), Reis (*Oryza spec.*) (Joshi et al. 2000), Tomate (*Lycopersicon spec.*) (Kochieva et al. 2002) und Kichererbse (*Cicer spec.*) (Iruela et al. 2002). Eine Untersuchung von Hybriden bei Wildpflanzenpopulationen wurde erstmals 1998 von Wolfe et al. beschrieben.

Arbeiten, die sich mit der Vergleichbarkeit von möglichen genetischen Markern beschäftigen, bestätigen die Zuverlässigkeit der Ergebnisse, die mit der ISSR-Technik erzielt werden, z. B.: ISSR versus RFLP und RAPD (Nagaoka & Ogihara 1997), ISSR versus RAPD (Pujar et al. 2002), ISSR versus pp-ISSR = „primer-pair ISSR“, RAMP = „randomly amplified microsatellite polymorphism“, SAMPL = „selective amplification of microsatellite polymorphic loci“ und pp-RAPD“ = primer-pair–random amplification of polymorphic DNA” (De Leon & Jones 2004).

Auch im Insektenreich gibt es Anwendungsbeispiele für die ISSR-Methode:

Die intraspezifische Variation neuseeländischer und südfranzösischer *Microctonus aethioides* (Hymenoptera: *Braconidae*) erklärt die unterschiedliche Fähigkeit, *Sitona lepidus* (Coleoptera: *Curculionidae*) zu parasitieren (Phillips et al. 2002). In Indien wurde die genetische Variabilität verschiedener Populationen des Seidenspinners *Antheraea mylitta* Drury analysiert (Chatterjee et al. 2004). Des weiteren gelang es beim wirtschaftlich genutzten Seidenspinner *Bombyx mori*, ISSR-Markern bestimmte Produktivitätseigenschaften zuzuordnen (Chatterjee & Mohandas 2003). Mit Hilfe des ISSR-Verfahrens konnten ebenfalls bei *Bombyx mori* zwei Gruppen erkannt werden, von denen sich eine mit und die andere ohne Diapause entwickelt (Reddy et al. 1999). Insofern ist die ISSR-Methode als neue Datenquelle für die Aufdeckung genetischen Polymorphismus auch bei Lepidopteren anerkannt (Hundsdoerfer & Wink 2005).

2.4 Theoretische Grundlagen der ISSR-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde vom US-Amerikaner Kary B. Mullis (1986) entwickelt, dem für seine Entdeckung 1993 der Nobelpreis verliehen wurde. Die PCR („polymerase chain reaction“) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren: Spezifische DNA-Sequenzen können in einem einzigen Reaktionszyklus in vitro mit hoher Ausbeute amplifiziert werden.

Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht der Replikation der DNA in der Zelle: Eine DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen Nukleinsäure-Matrize. In der Zelle braucht das Enzym dazu einen (RNA)-Primer, ein Nukleinsäuremolekül, das mit dem Matrizenstrang hybridisiert und von der Polymerase als Starter genutzt wird. Im Labor werden künstlich synthetisierte Oligonukleotidprimer verwendet, die als Startmoleküle aus den flankierenden Bereichen der Matrize abgeleitet sind, weshalb das zu amplifizierende Fragment zwischen ihnen liegt. Indem man doppelsträngige DNA auf Temperaturen nahe dem Siedepunkt erhitzt (Denaturierung, ca. 94 °C), lassen sich einzelsträngige Vorlagen einfach erzeugen. Bei der ISSR-PCR wird nur ein einziger Oligonukleotidprimer (16–20 bp) verwendet, der mit „Mikrosatelliten-Repeats“ identisch ist. Dieser Primer wird immer dann ein eindeutiges PCR-Produkt liefern, wenn in einem gewissen Abstand ein zweiter, aber in der Orientierung umgedrehter (invertierter) „Repeat“-Bereich auftritt. Somit beginnen die neu synthetisierten DNA-Stränge jeweils mit der Primer-Sequenz, reichen dann aber über die Position des Primers des gegenüberliegenden Stranges hinaus. Folglich entstehen auf jedem neuen DNA-Strang auch wieder neue Primer-Bindungsstellen. Beim „Annealing“, dem zweiten Schritt (ca. 50 °C), hybridisieren die (identischen) ISSR-Oligonukleotidprimer mit den beiden DNA-Matrizensträngen und dienen damit im dritten Schritt (Polymerisation, ca. 70 °C) der DNA-Polymerase als Startmoleküle zur Kopierung der beiden Matrizenstränge. Man trennt die ursprünglichen und neu entstandenen Stränge, indem man das Reaktionsgemisch erneut erhitzt. Diese stehen dann für weitere Runden der Primer-Hybridisierung, DNA-Synthese und Strangtrennung zur Verfügung. Als Endergebnis einer PCR enthält das Reaktionsgemisch die exponentiell vervielfältigten Kopien der DNA-Sequenz zwischen den Primern bzw. bei der ISSR-PCR zwischen den Mikrosatelliten. Man benötigt somit für die Reaktion eine DNA-Matrize, eine DNA-Polymerase, Desoxynukleotide, bei der ISSR-Methode einen Oligonukleotidprimer und ein geeignetes Puffersystem. In Abbildung 2.13 wird das Prinzip der ISSR-PCR dargestellt.

2.5 ISSR-PCR in der Praxis

2.5.1 Behandlung des Tiermaterials

Die Falter wurden in ihren natürlichen Biotopen mit dem Kescher gefangen und direkt in Kryoröhrchen eingebracht, die - mit den Fundortdaten beschriftet - unmittelbar in flüssigen Stickstoff überführt wurden, was den sofortigen Tod der Tiere zur Folge hatte. Eine entsprechende Stickstofftransportkanne („Airliquide GT3“) wurde auf jeder Exkursion mitgeführt. Dieses Verfahren wurde gewählt, damit mit den Tieren auch gegebenenfalls allozym-elektrophoretische Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Diese wären bei einer ebenfalls denkbaren Aufbewahrung in Alkohol nicht mehr möglich gewesen, da die Allozyme hier zerstört worden wären. Die Proben wurden nach den Exkursionen entweder direkt oder nach einer kurzen Zwischenlagerung bei -26 °C in einen Ultragefrierschrank überführt und dort bei -80 °C aufbewahrt.

2.5.2 DNA-Extraktion

Für die molekularbiologische Untersuchung wurde den Faltern jeweils ein Bein des dritten Beinpaars entnommen. Diese Arbeit wurde auf Eis durchgeführt, um die temperaturempfindlichen Enzyme des restlichen Körpers für eventuelle spätere Analysen (s.o.) nicht zu zerstören. Das Bein wurde unter weitgehend sterilen Bedingungen mit einem Skalpell in kleine Stücke zerteilt, um die quantitative Extraktion der DNA zu ermöglichen und die Extraktionszeit zu verkürzen. Das Extraktionsverfahren folgte dem Protokoll des „QIAmp DNA Mini Kits“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland).

Die Lagerung der im Puffer gelösten DNA erfolgte bei -20 °C .

2.5.3 DNA-Qualitätsprüfung

Bevor die isolierte DNA der ISSR-PCR unterworfen wurde, erfolgte eine Qualitätskontrolle mit Hilfe einer Gelelektrophorese. Hierzu wurden $3\text{ }\mu\text{l}$ des jeweiligen DNA-Isolats mit $2\text{ }\mu\text{l}$ DNA-Probenpuffer gemischt, auf ein horizontales Agarosegel (1 %) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung des Agarosegels wurde die Agarose (Seakem LE[®]) in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in einer Mikrowelle vollständig gelöst. Die noch heiße Lösung wurde in eine Elektrophoreseapparatur gegossen, wobei ein „Kamm“ eingesetzt wurde, der die Aussparungen für die Untersuchungsproben erzeugte. Nach dem Abkühlen und der Gelierung des

Gels erfolgte die Zugabe des Laufpuffers (1x TAE-Puffer) und die Herausnahme des Kammes. Anschließend erfolgte die Befüllung der Probentaschen, wobei neben den eigentlichen Proben zwei Taschen den DNA-Längenstandards (250 bp) der Firma Invitrogen vorbehalten waren. Dies diente der späteren Charakterisierung der Fragmentgrößen. Die Elektrophorese wurde 20 Minuten lang bei einer angelegten Spannung von 120 Volt und einer Stromstärke von 2 Ampère durchgeführt. Mit Hilfe des im Probenpuffer enthaltenen Farbstoffes Bromphenolblau konnte man die Wanderung der DNA zur Anode gut verfolgen, wobei Bromphenolblau ungefähr die Wanderungsgeschwindigkeit eines etwa 300 bp großen DNA Fragmentes besitzt. Um die DNA zu detektieren, wurde das Agarosegel nach Beendigung der Elektrophorese für etwa eine Minute in ein mit dem Farbstoff Ethidiumbromid versetztes Wasserbad überführt (2 mg Ethidiumbromid in 150 ml destilliertem Wasser). Ethidiumbromid interkaliert mit den DNA-Molekülen und emittiert bei Anregung mit UV-Licht (254 – 366 nm) orange-rotes Licht (590 nm). Nach Ablauf der Färbezeit wurde das Gel unter ultraviolettem Licht ausgewertet und fotografiert. Es wurden nur Proben einer ISSR-PCR unterworfen, wenn sie bei der Qualitätsprüfung eine klare Bande zeigten. In diesem Fall konnte davon ausgegangen werden, dass die DNA intakt war und sauber extrahiert werden konnte. So konnte die DNA von präparierten Sammlungstieren bei der Qualitätsprüfung nicht detektiert werden, ein Vergleich mit dem eingefrorenen Material war daher nicht möglich.

2.5.4 Praktische Durchführung der ISSR-PCR

Aus einem von der University of British Columbia („UBC“) Biotechnology Laboratory (Vancouver, BC, Canada: <http://www.biotech.ubc.ca>) angebotenen „Primer Set #9“, bestehend aus 100 Primern, wurden 90 Primer ausgewählt und einem Screening unterworfen. Hierfür wurde die DNA von drei Faltern ausgewählt, die die zwei Taxa *M. a. athalia* sowie *M. a. celadussa* repräsentierten, um bereits hier schon erste Hinweise auf eine Eignung der jeweiligen Primer zur Unterscheidung beider Taxa erhalten zu können. Teilweise wurde ergänzend auch DNA anderer *Melitaea*-Arten (*M. didyma*, *M. deione*) mitgetestet. Für dieses Screening wurde ein Standardprotokoll (Chatterjee & Mohandas 2003) ausgewählt. Primer, die mit diesem Protokoll bei der anschließenden Agarosegelelektrophorese keine oder keine verwertbaren Banden zeigten („Schmier“), wurden vom weiteren Screening ausgeschlossen. Die verbliebenen Primer wurden einem umfangreichen Optimierungsscreening unterzogen, in welchem Parameter wie die

Konzentration der Primer, des Magnesiumgehaltes, der Taq-Polymerase ebenso variiert wurden wie die Annealingtemperatur oder die Anzahl der PCR-Zyklen. Es zeigte sich, dass nur in wenigen Fällen eine Abänderung des ursprünglich gewählten Protokolls zu besser interpretierbaren Ergebnissen führte.

Die PCR-Reaktionen wurden bevorzugt in einem PTC 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, Mass., USA) durchgeführt.

Als Standard wurde folgender Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl gewählt:

- 2,5 µl 10x PCR-Puffer („Taq Buffer with Mg²⁺“, Fa. Eppendorf, Mg²⁺-Gehalt 1,5 mM)
- 2,5 µl dNTP-Mix (2 mmol/µl (0,2 mM von jedem der 4 dNTPs))
- 0,4 µl Primer (ca. 0,24 µM/Ansatz)
- 0,3 µl Taq-Polymerase (5 U/µl, Eppendorf)
- 1,0 µl DNA (Konzentration nicht ermittelt)
- 18,3 µl autoklaviertes Wasser (reinst)

Das „UBC SSR Primer Oligonucleotid Set #9“ enthält die Oligonukleotidprimer in einer Konzentration von 3 – 4 nmol in luftgetrockneter Form. Die Primer werden in 2 ml Eppendorfgläsern geliefert und sind von 800 – 900 nummeriert. Sie werden mit 200 µl autoklaviertem Wasser überschichtet und resuspendiert; hierdurch entsteht eine 15 µM Lösung des jeweiligen Primers. Die Lösung wird aliquotiert und bei –20 °C aufbewahrt.

Die Tabelle 2.7 enthält die Primer mit Ihren Sequenzen, die grundsätzlich detektierbare Signale ergaben. Primer, die nicht aufgelistet sind, ergaben keine oder sehr schlechte Banden.

Die zehn fettgedruckten Primer wurden in die Hauptuntersuchung einbezogen, da sie bereits unter Standardbedingungen besonders deutliche und / oder vielversprechende Banden zeigten.

Tab. 2.7: Auflistung der bei einem Screening für die ISSR-PCR bei *Melitaeini* erfolgreich getesteten Primer. Die fettgedruckten Primer wurden für die Hauptuntersuchung ausgewählt. Die Basenabkürzungen entsprechen dem IUPAC-Code für Nukleinsäuren. Anmerkung: R=A/G, Y=C/T, B= C/G/T, D=A/G/T, H=A/C/T, V=A/C/G, bp=Anzahl Basenpaare

UBC-Primer	Sequenz (5' - 3')	Länge (bp)
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	17
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	17
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	17
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	17
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	17
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	17
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	17
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	17
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	17
819	GTG TGT GTG TGT GTG TA	16
820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	17
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	17
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	17
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	18
836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	18
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	18
844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	18
850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	18
851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	18
855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	18
856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	18
857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	18
861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC	18
862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	18
865	CCG CCG CCG CCG CCG CCG	18
867	GGC GGC GGC GGC GGC GGC	18
868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA	18
878	GGA TGG ATG GAT GGA T	16
880	GGA GAG GAG AGG AGA	15
881	GGG TGG GGT GGG GTG	15
884	HBH AGA GAG AGA GAG AG	18
885	BHB GAG AGA GAG AGA GA	17
890	VHV GTG TGT GTG TGT GT	17
891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	17

Das gewählte Temperaturprofil für die PCR folgt Chatterjee & Mohandes (2003):

Vor dem ersten Zyklus wurde eine zweiminütige Denaturierung durchgeführt, um die Einsträngigkeit aller Matrizenmoleküle sicherzustellen. Nach dem letzten Zyklus wurde ein zehnmütiger Polymerisationsschritt angeschlossen, um der Taq-Polymerase zu ermöglichen, alle synthetisierten Stränge zu vervollständigen.

Tab. 2.8: Darstellung des standardmäßig verwendeten PCR-Temperaturprofils

Initialdenaturierung	94°C für 2 min	
Amplifizierung	94°C für 30 s	} 35x
	50°C für 30 s	
	72°C für 2 min	
Abschlusszyklus	72°C für 10 min	
	15°C für ∞	

Teilweise mußte das Versuchsprotokoll abgeändert werden:

Bei Primer 862 wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Ergebnisqualität zu verbessern. Dies gelang schließlich auch mit der Verwendung von „HotMaster Taq DNA Polymerase“, zusammen mit dem dazugehörigen „HotMaster Taq Puffer“ der Firma Eppendorf, die die entsprechenden Standardkomponenten ersetzen.

Primer 865 schien bereits nach dem ersten Screening artspezifische Marker produzieren zu können. Leider war die Qualität der auszuwertenden Gele unter Standardbedingungen (s.o.) schlecht. Es waren lange Versuchsreihen erforderlich, bis die optimalen Versuchsbedingungen herausgefunden waren. Der Durchbruch gelang mit der Hinzufügung der Q-Solution der Firma Qiagen. Der optimierte PCR-Ansatz für Primer 865 sah wie folgt aus:

2,5 µl 10x PCR-Puffer („Taq Buffer with Mg²⁺“, Eppendorf, Mg²⁺-Gehalt 1,5mM)

2,5 µl dNTP-Mix (2 mmol/µl (0,2mM von jedem der 4 dNTPs))

5,0 µl Q-Solution (Qiagen)

0,4 µl Primer (ca. 0,24µM/Ansatz)

0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl, Eppendorf)

1,5 µl DNA (Konzentration nicht ermittelt)

12,8 µl autoklaviertes Wasser (reinst)

Des Weiteren wurde die **Annealingtemperatur** von 50° C auf **51,5° C** heraufgesetzt.

Die Änderungen zu den Standardbedingungen sind durch Fettdruck und Kursivstellung hervorgehoben.

2.5.5 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente

Mit Hilfe der Elektrophorese lassen sich elektrisch geladene Teilchen auf Grund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrisch geladenen Feld trennen. Zur Optimierung der Untersuchungsergebnisse wurden entsprechende Vorversuche durchgeführt und folgende Parameter ermittelt:

Agarosetyp:	Seakem LE [®]
Agarosekonzentration:	2%
Lösungs-/Elektrophoresepuffer:	1x TAE
Ethidiumbromidzusatz im Gel:	nein
Spannung:	120 Volt
Laufzeit:	120 Minuten
Gelgröße / Taschenanzahl („Slots“):	29 (24 Proben + 5 Marker)
Probenmenge/Slot:	2 µl PCR-Produkt + 2 µl Probenpuffer
Marker (DNA-Längenstandard):	im Abstand von 6 Proben

Die Seakem LE[®] Agarose erwies sich in der Trennung der DNA-Fragmente erwartungsgemäß der ebenfalls getesteten NUSieve[®] Agarose als überlegen.

Verschiedene Konzentrationen bedingen unterschiedliche Trenneigenschaften: Getestet wurden die Konzentrationen 0,5 % - 1 % - 1,3 % - 1,5 %- 1,8 % sowie 2 %. Zwar ließ sich die Laufzeit durch den Einsatz niedriger Gelkonzentrationen verringern, in gleichem Maße verschlechterten sich aber auch die Trenneigenschaften. Letztlich zeigten die 2 %-igen Gele zudem weniger Verwerfungen.

Obwohl sowohl mit 1x TBE als auch mit 1x TAE Puffer gleich gute Ergebnisse erzielt wurden, erwies sich der TAE-Puffer als stabiler und somit als wirtschaftlicher. Er konnte ohne Qualitätsverlust für bis zu 4 Elektrophoresen benutzt werden, ohne ausgetauscht werden zu müssen.

Obwohl in der Literatur häufig Hinweise finden, dass Ethidiumbromid direkt in das Gel eingearbeitet wird (z. B. Galusser et al. 2004), führte dies bei der gegebenen Versuchsanordnung zu großen Problemen. Der Vorteil der Direkteinarbeitung liegt darin, dass sich die Banden unmittelbar nach der Beendigung der Elektrophorese unter UV-Licht detektieren lassen (besser: lassen sollen). Man erspart sich so die sonst nötige Färbung in einer Färbewanne. Dieser

Arbeitsschritt trägt immer das Risiko einer Kontamination der Umgebung (Labortisch, Kittel u.a.) in sich. Offenbar ist wenig bekannt, dass sich Ethidiumbromid in einem elektrischen Feld ebenfalls bewegt und sich kathodal ansammelt, so dass die kleineren DNA-Fragmente, die am weitesten gewandert sind, mangels Farbstoff kaum bis gar nicht mehr detektiert werden können, während die größeren Fragmente durch die hohe Konzentration des Ethidiumbromids in ihrem Bereich oftmals überstrahlt werden. Zumindest bei einer langen Laufzeit von 2 Stunden ist das Färben des Gels **nach** Beendigung der Elektrophorese Voraussetzung für eine zuverlässige Detektion.

Die Spannung und die Laufzeit wurden empirisch ermittelt. Höhere Spannung führte zu übermäßiger Erwärmung des Puffers und in der Folge zu ungleichmäßigen Laufstrecken der Proben.

Der Einsatz von Gelen, die möglichst viele Proben aufnehmen (hier 22 - 24 zuzüglich 3 – 5 Marker), erwies sich als wirtschaftlich, zeit- und ressourcensparend. Es gab keine Nachteile gegenüber Gelen, die weniger, dafür aber größere Probenslots besaßen.

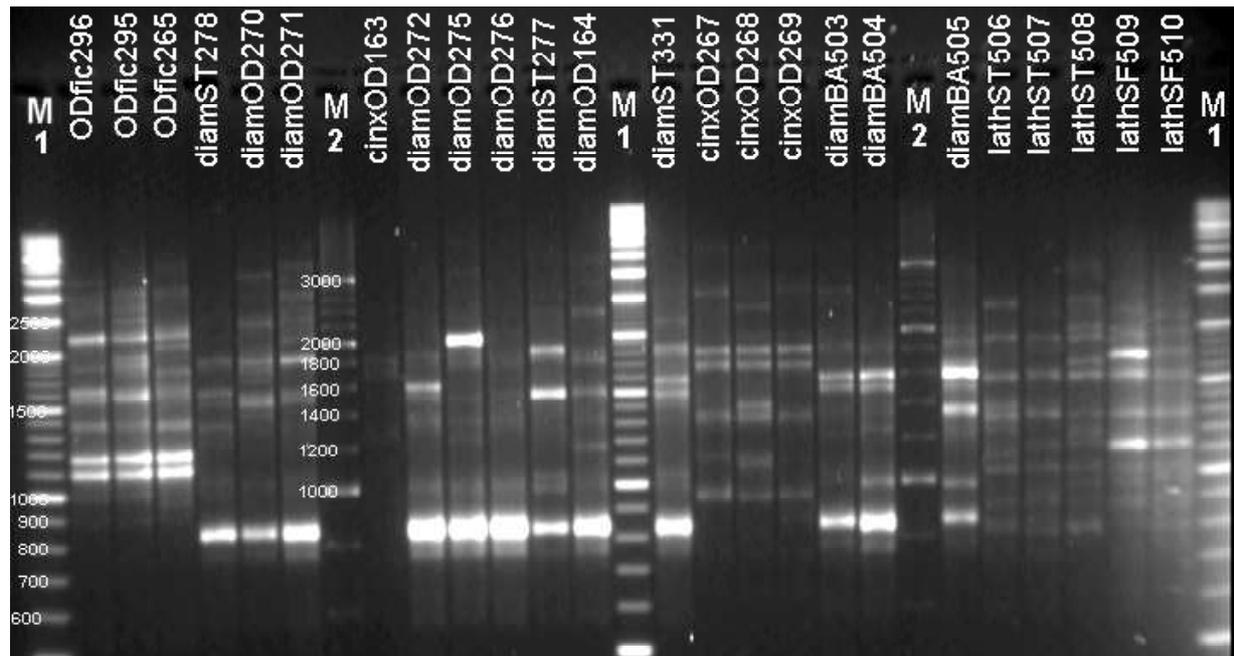
Die anfangs benutzte DNA Leiter („100 bp DNA Ladder“, Invitrogen) erwies sich im Laufe der Untersuchungen als weniger geeignet. So konnten die DNA-Fragmente im Bereich zwischen 1500 bp und 2000 bp sowie ab 2072 bp (= Endpunkt der Leiter) nicht zufriedenstellend bestimmt werden. Als optimal erwies sich die Kombination des „Orange Ruler 200 bp DNA Ladder“ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) mit der „Superladder-mid1 100 / 500 bp“ (Eurogentec, Köln, Deutschland) in jeweils getrennten Slots. Hiermit ließen sich alle Fragmente zwischen 200 bp und 4500 bp zuverlässig bestimmen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel ca. 1 Minute in eine mit Ethidiumbromidlösung (2 mg Ethidiumbromid in 150 ml destilliertem Wasser) gefüllte Wanne gelegt, die leicht bewegt wurde, um eine gleichmäßige Anfärbung der DNA-Fragmente zu erreichen. Anschließend wurde das Gel 30-60 Minuten in destilliertem Wasser auf einer Schüttelapparatur bewegt, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen. Erst dann konnte das Gel unter UV-Licht sinnvoll beurteilt werden. Die gefärbten Gele wurden grundsätzlich mehrfach fotografiert und digitalisiert. Um die Gele auswerten zu können, mussten zunächst die Fotos in einen Computer eingescannt werden. Dieser Schritt entfällt, wenn man die Bilder direkt digitalisiert. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass teures Fotopapier eingespart werden kann und Qualitätseinbußen durch den zusätzlichen Scanschritt vermieden werden können. Die Gelfotographien wurden in einem Bildbearbeitungsprogramm (*MICROGRAFX PICTURE*

PUBLISHER 8.0, ADOBE PHOTO SHOP 7.0) optisch aufbereitet und anschließend mit Hilfe des Programms „*CROSS CHECKER 2.9*“ (<http://www.spg.wau.nl/pv/pub/CrossCheck/>) ausgewertet.

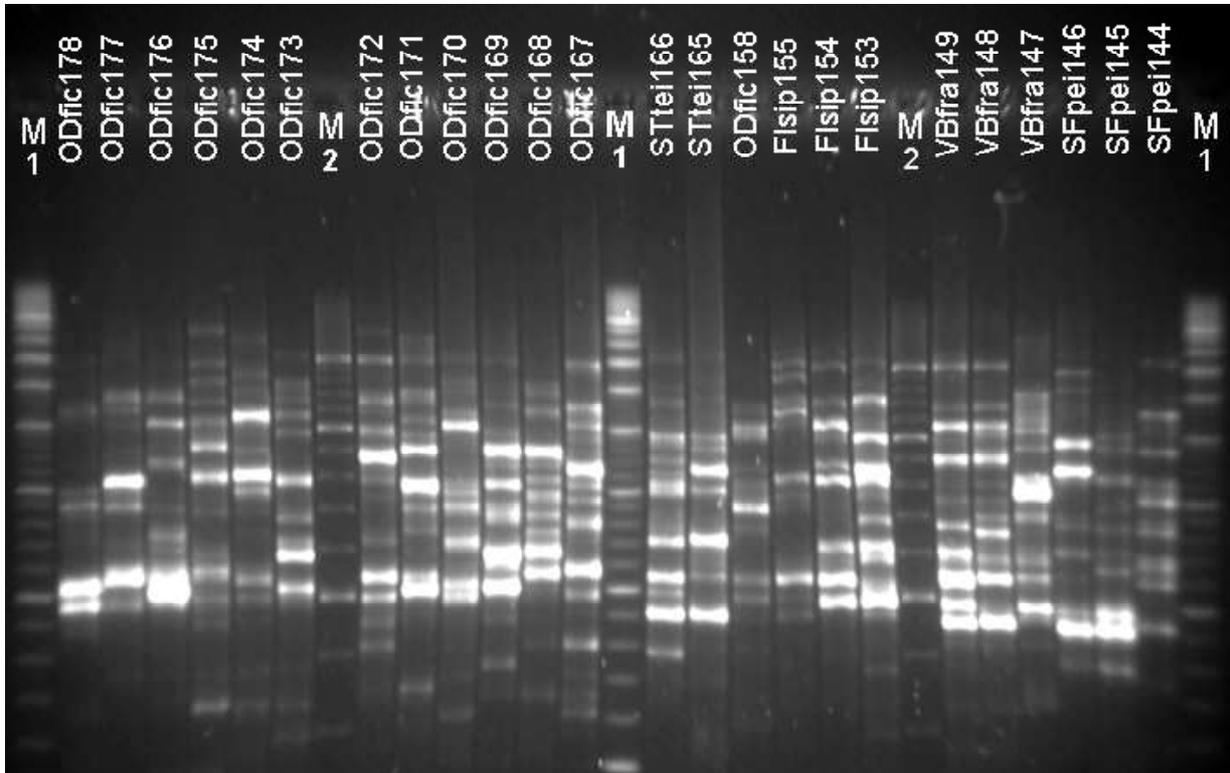
Abb. 2.14: Beispiel für ein Bandenmuster, welches mit Primer UBC-865 erhalten wurde.

Die 4 Arten *M. athalia* („ODfic“), *M. diamina* („diam“), *M. cinxia* („cinx“) und *I. lathonia* („lath“) sind gut zu unterscheiden. Die Fotografie des Gels wurde unter der Bezeichnung „865_8“ archiviert.



Erklärung zu den Kürzeln: OD = Ostdeutschland, ST = Südtirol, BA = Bayern, SF = Südfrankreich, fic = Fichtelberg; die nachfolgenden Ziffern sind jeweils einem bestimmten Individuum zugeordnet. M = Marker: M1 = „Superladder-mid1 100 / 500 bp“, Fa. Eurogentec; M2 = „O’Range Ruler 200 bp“, Fa. Fermentas.

Abb. 2.15: Beispiel für ein hochpolymorphes Bandenmuster, welches mit Primer UBC-855 erhalten wurde. Enthalten sind Stichproben der *M. athalia*-Populationen vom Fichtelberg, aus Südtirol, Finnland, Vorarlberg und Südfrankreich. Die Fotografie des Gels wurde unter der Bezeichnung „855_3“ archiviert



Erklärung zu den Kürzeln: OD = Ostdeutschland, ST = Südtirol, FI = Finnland, SF = Südfrankreich, VB = Vorarlberg, fic = Fichtelberg, fra = Frastanz, pei = Peira Cava, sip = Sipoo, tei = Teis; die nachfolgenden Ziffern sind jeweils einem bestimmten Individuum zugeordnet. M = Marker: M1 = „Superladder-mid1 100 / 500 bp“, Fa. Eurogentec; M2 = „Orange Ruler 200 bp“, Fa. Fermentas.

2.5.6 Gewinnung der Basisdaten

Nur eindeutig zuzuordnende Banden wurden in die Auswertung einbezogen. Bei Unklarheiten wurde die Elektrophorese der fraglichen Proben zur Absicherung wiederholt. Gleich große Fragmente bei einem Primer wurden als homolog angesehen und repräsentierten somit einen einzelnen ISSR-Locus. Für jedes Individuum liegt ein Vektor aus Nullen und Einsen vor, der das Vorhandensein (1) oder Fehlen (0) der beobachteten Merkmale, in diesem Fall einzelner Banden auf einem Gel, charakterisiert. Somit werden binäre Merkmale (0/1-Merkmale) zwangsläufig zu binären Daten (0/1-Daten). Alle auswertbaren ISSR-Daten wurden in eine Excel-Tabelle übertragen, die als Basis für die verschiedenen Auswertungen diente und je nach verwendeter Software entsprechend transformiert wurde.

Anhand der gewonnenen Markerdaten werden die genotypischen Unterschiede zwischen dem untersuchten Material erfasst. Danach wird auf der Basis dieser Daten die genetische Distanz

berechnet und das Ergebnis mit Hilfe multivariater Methoden dargestellt. Insofern besteht jede Analyse aus einem mehrstufigen Prozess.

2.6 Analyse der gewonnenen Daten

2.6.1 Genetische Diversität

Die genetische Diversität bezeichnet die Vielfalt bzw. Mannigfaltigkeit in der genetischen Zusammensetzung von Organismengruppen auf derselben oder auf unterschiedlichen Organisationsstufen. Sie ist ein Ergebnis der Evolution und daher eine Konsequenz der Wirkung der verschiedenen Evolutionsfaktoren, insbesondere von Mutation, Selektion, Zufallsdrift und Migration sowie der Vermehrungsstruktur von Populationen. Die Charakterisierung der genetischen Diversität kann auf der Ebene von Individuen, Populationen, Arten oder auch hinsichtlich höherer taxonomischer Einheiten erfolgen. Die Erfassung der genotypischen Unterschiede kann auf unterschiedliche Art und Weise vorgenommen werden, beispielsweise anhand von Unterschieden in den DNA-Sequenzen, Genen, molekularen oder biochemischen Markern, Proteinen oder auch an „klassischen“ morphologischen Merkmalen. Dabei können auch andere Informationen, z. B. biogeographische, einbezogen werden.

Genetische Diversität sollte nicht mit Gendiversität („gene diversity“) verwechselt werden. Letztere gibt den Anteil der genetische Variation einer Population wieder (s. 2.6.2.3).

Die durch molekularbiologische Techniken wie z. B. RFLP, AFLP, RAPD, SSR und ISSR gewonnenen Marker unterscheiden sich vor allem in der Art ihrer Vererbung: Während RFLP-Marker und Mikrosatelliten (SSR) eine kodominante Vererbung zeigen, werden die zufällig verteilten RAPD-, AFLP- und ISSR-Marker dominant vererbt. Somit können Heterozygoten nicht direkt erkannt werden. Dieses Wissen ist bei der Wahl von Distanz- oder Ähnlichkeitsmaßen von Bedeutung.

Genetische Distanzen drücken genetische Unterschiede / Ähnlichkeiten zwischen Individuen oder Populationen durch eine einzige Zahl aus, die in der Regel zwischen = 0 (kein Unterschied) und 1 (maximaler Unterschied) liegt (Dice 1945). Die Analyse der genetischen Diversität anhand von ISSR-Markern wird auf der Basis von binären Daten durchgeführt. Hierbei liegt für jedes Individuum ein Vektor aus Nullen und Einsen vor, der das Vorhandensein (1) oder Fehlen (0) des beobachteten Merkmals, z. B. einzelner Banden auf einem Agarosegel, charakterisiert.

2.6.2 Berechnung der genetischen Distanzen

Die genetische Distanz ist am einfachsten tabellarisch (als Matrix paarweiser Distanzen) darstellbar, jedoch werden solche Tabellen rasch unübersichtlich und unbrauchbar, wenn die Anzahl der Genotypen höher wird. Beispielsweise führt eine Analyse von 60 Individuen (Taxa) bereits zu einer Anzahl von 1770 paarweisen Distanzen und damit zu einer sehr großen Tabelle. Wesentlich übersichtlicher ist daher bei großen Datenmengen die Überführung der Distanzmaße in ein Dendrogramm.

Die Wahl des statistischen Maßes zur Berechnung genetischer Ähnlichkeiten / Distanzen hängt vor allem von der Fragestellung der Studie, vom untersuchten genetischen Material und davon, welches Markersystem zur Erfassung genotypischer Unterschiede verwendet wurde, ab. So wird der Ähnlichkeitskoeffizient von Jaccard (Jaccard 1908) für die Analyse von dominanten Markerdaten empfohlen, während der Assoziationskoeffizient nach Dice (Dice 1945) eher für kodominante Marker verwendet werden sollte (Link et al. 1995). Dennoch werden beide Koeffizienten bei dominanten Markern (RAPD, ISSR) verwandt. Da es noch keine umfangreichen Erfahrungen mit der ISSR-Methode gibt, fehlt es bisher an gewissen Standardisierungen. Daher werden in dieser Arbeit auch mehrere Indizes vergleichsweise untersucht und ausgewertet.

2.6.2.1 Dice-Index

Der Assoziationskoeffizient D_{xy} nach Dice (1945) betont gemeinsame Merkmale von Individuen (hier gemeinsame ISSR-Fragmente) doppelt so stark wie der Jaccard-Index. Gemeinsam fehlende Merkmale werden ignoriert. Der Wertebereich liegt somit zwischen 0 (keine gemeinsamen Banden) und 1 (gemeinsame Banden). Der Dice-Index ist identisch mit der genetischen Distanz nach Nei & Li (Nei & Li 1979). Der Dice Ähnlichkeitskoeffizient D_{xy} berechnet sich wie folgt:

$$D_{xy} = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y + 2n_{xy}}$$

x und y bezeichnen die beiden zu vergleichenden Individuen
 n_{xy} Anzahl gemeinsamer Banden
 n_x und n_y Anzahl Banden der Einzelindividuen

Die Berechnung des Dice-Index erfolgte mit der Software *PAST 1.4 2006* (Hammer et al. 2001).

2.6.2.2 Jaccard-Index

Jaccard- und Dice-Koeffizient unterscheiden sich in der Wichtung der in beiden Linien gemeinsam vorkommenden Markerbanden: Beim Jaccard-Index, der auch als „Tanimoto Ähnlichkeitsmaß“ bekannt ist, werden die Anzahl gemeinsamer Banden im Gegensatz zum Dice-Index nur einfach gewertet. Der Jaccard Ähnlichkeitskoeffizient berechnet sich wie folgt:

$$J_{xy} = \frac{n_{xy}}{n_x + n_y + n_{xy}}$$

x und y bezeichnen die beiden zu vergleichenden Individuen

n_{xy} Anzahl gemeinsamer Banden

n_x und n_y Anzahl Banden der Einzelindividuen

Ebenso wie beim Dice-Index werden beim Jaccard-Index fehlende Banden nicht berücksichtigt und somit hierbei keine Homologien angenommen.

Die Berechnung des Jaccard-Index erfolgte mit der Software *PAST 1.4 2006* (Hammer et al. 2001).

2.6.2.3 Gendiversität h nach Nei (1973)

Eines der gebräuchlichsten Maße für die Gendiversität („gene diversity“) wurde von Nei (1973) vorgeschlagen. Die Gendiversität an einem Locus ist folgendermaßen definiert:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^q x_i^2$$

x_i Populationsfrequenz des i -ten Allels

q Anzahl Allele

Dementsprechend versteht man unter der durchschnittlichen Gendiversität den Mittelwert dieses Maßes über alle Loci. Die Gendiversität ist ein Maß der genetischen Variation einer Population und wird manchmal auch als Heterozygotität bezeichnet. Der Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass zwei zufällig gewählte Kopien eines Gens verschiedene Allele darstellen. Die Größenordnung für diesen Parameter bewegt sich auf einer Skale von 0, alle Individuen sind gleich, bis 1, alle Individuen sind unterschiedlich. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms *POPGENE 1.32*, Version Dezember 2000 (Yeh & Boyle 1997).

2.6.2.4 Shannon-Index I

Der Shannon-Index I („Shannon information measure“, „Shannon diversity index“) wird als Maß für die Gesamtdiversität herangezogen, wobei höhere Werte einer größeren genetischen Diversität entsprechen. Ursprünglich stammt er aus der Informationstheorie (Shannon & Weaver 1949). Er berechnet sich wie folgt:

$$I = -\sum p_i \log_2 p_i$$

p_i bezeichnet die Frequenz eines bestimmten ISSR-Fragmentes

Da ISSR-Marker dominant sind, können Heterozygoten nicht direkt interpretiert werden. Der Shannon-Index ist diesbezüglich unproblematisch und daher für die Untersuchung gut geeignet. Der Wert liegt, wie bei der Gendiversität h nach Nei (1973), zwischen 0 und 1. Die Berechnung des Shannon-Index I erfolgte mit der Software *POPGENE 1.32*, Version Dezember 2000 (Yeh & Boyle 1997).

2.6.2.5 Raup-Crick-Index

Der Raup-Crick-Index (Raup & Crick 1979) stammt ursprünglich aus der Paläontologie. Ebenso wie bei den Indizes nach Dice und Jaccard bewertet auch er Beziehungen zwischen Stichproben nach Vorhandensein oder Fehlen eines Merkmals. In seiner ursprünglichen Anwendung in der Faunistik bezieht sich dieses Vorhandensein oder Fehlen auf das Vorkommen einer Stichprobe z.B. in einem Lebensraum. Der Grund, diesen Index hier anzuwenden, liegt darin, dass er eine allgemeinere Klasse von Indizes repräsentiert, die ein Bootstrappingverfahren integriert haben.

Es wird eine Randomisierung, ein sog. „Monte-Carlo-Verfahren“ benutzt, wobei die gefundenen Wertebeziehungen durch 200 zufällige Wiederholungen statistisch geprüft werden.

Die Software *PAST 1.4 2006* (Hammer et al. 2001) bietet die Möglichkeit an, dieses Verfahren auf die entsprechenden Datensätze anzuwenden.

2.6.2.6 Quadrierte euklidische Distanz D

Der Koeffizient D bezeichnet die quadrierte euklidische Distanz, d.h. der Abstand zwischen zwei Individuen ist die Quadratwurzel aus der Summe der quadrierten Wertedifferenzen über jeder Variablen. Hierbei werden gemeinsame Banden nicht berücksichtigt. Die euklidische Distanz D und die genetische Distanz nach Nei & Li (1979) sind nach Huff et al. (1993) nahezu austauschbar. D stellt ein quantitatives Maß für die Unähnlichkeit zweier Individuen dar und ist wie folgt definiert:

$$D = \sqrt{\sum_k (n_{kx} - n_{ky})^2}$$

X, y	stehen für die beiden zu vergleichenden Individuen
k	Anzahl vergleichbarer Banden jedes Individuums
n_x, n_y	Anzahl Banden jedes Individuums

Die quadrierte euklidische Distanz D wurde zur Errechnung der Varianzkomponenten mit dem Programm *ARLEQUIN ver. 3.0*, Version Februar 2006 (Excoffier et al. 2005) verwendet.

2.6.2.7 Fixationsindex F_{st}

Der durch Wright (1978) eingeführte F_{st} -Wert ist ein sog. Fixationsindex, der angibt, wie stark sich eine Population von einer anderen Population oder einer Grundgesamtheit genetisch differenziert hat. Aus den Daten wurden mit dem Programm *ARLEQUIN ver. 3.0* die paarweisen F_{st} -Werte zwischen den einzelnen Populationen berechnet, die zur Beschreibung von genetischen Distanzen, die innerhalb kurzer Zeitspannen der Evolution entstehen, gut geeignet sind (Reynolds et al. 1983, Slatkin 1995). Er drückt die Abnahme der Variation in Subpopulationen relativ zu der Variation der unterteilten Gesamtvariation infolge genetischer Drift aus. Dadurch gibt er den Anteil an Diversität an, der auf die Diversität zwischen den Populationen entfällt. Ist $F_{st} = 0$, so bilden die Tiere eine einzige panmiktische Population. Ist der F_{st} -Wert dagegen signifikant von

Null verschieden, so deutet dies auf eine entsprechende genetische Differenzierung zwischen den Populationen hin. Als Distanzmethode wurde die Anzahl der Unterschiede (Euklidische Distanz) verwendet. Die Signifikanz der F_{st} -Werte wurde auf dem 99 % Niveau durch das Programm mit einem nicht-parametrischen Permutationsverfahren mit 1000 Wiederholungen überprüft. Indem die paarweisen F_{st} -Werte als genetische Distanzen verwendet wurden, konnte ein Dendrogramm erstellt werden. Hierzu wurde die Matrix zunächst mittels eines Texteditors (*NOTEPAD*, enthalten in *MICROSOFT WINDOWS 98SE*) in eine Eingangsdatei („infile“) des Programms *PHYLIP* 3.65a (Felsenstein 2005) übertragen. Anschließend wurde mit dem Programm „*NEIGHBOR*“ – ebenfalls im *PHYLIP*-Programmpaket enthalten – mit Hilfe der UPGMA-Methode eine Ergebnisdatei („outtree“) erzeugt, welche in das Programm *TREEVIEW* (Win32) 1.6.6, Version September 2001 (Page 1996) übertragen und als Dendrogramm sichtbar gemacht wurde.

2.6.2.8 *Nm*-Wert

Der *Nm*-Wert („number of migrants per generation“) steht in einem direkten mathematischen Zusammenhang zum F_{st} -Wert und stellt ein Maß für den Genfluß zwischen Populationen dar.

Unter der Annahme, dass zwei Populationen der Größe N aus einer großen Zahl von Populationen jede Generation den Anteil m an Migranten untereinander austauschen und die Mutationsrate u im Vergleich zu der Migrationsrate m zu vernachlässigen ist, ergibt sich bei einem Gleichgewicht zwischen Mutation und Drift folgende einfache Beziehung:

$$Nm \cong \frac{1 - F_{ST}}{4F_{ST}}$$

Auch wenn der errechnete Wert mit Vorsicht zu interpretieren ist, so stellt er bis heute doch ein wichtiges Vergleichsmaß auch in Hinblick auf andere Studien dar. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm *ARLEQUIN* ver. 3.0.

2.6.3 Multivariate Statistik

2.6.3.1 Clusteranalyse / Dendrogramme

Mit Hilfe von Clusteranalysen kann man eine Vielzahl von ungeordneten Objekten aufgrund von Ähnlichkeit und sachlicher Verwandtschaft in kleine, homogene Gruppen zerlegen und somit klassifizieren. Dabei wird zwischen den zu beurteilenden Objekten, die in ihren Merkmalen mit Hilfe einer Datenmatrix beschrieben werden, zunächst nach bestimmten Algorithmen paarweise die Ähnlichkeit dieser Objekte gemessen, danach werden in einem zweiten Schritt mit Hilfe dieser Ähnlichkeiten Gruppen gebildet, wobei der Abstand zwischen Objekten innerhalb einer Gruppe stets kleiner ist als zwischen den Gruppen. „Ähnliche Objekte“ sind folglich solche, die nach Berücksichtigung aller ihrer Merkmale in der gleichen Gruppe zusammengefasst werden, „unähnliche Objekte“ gehören verschiedenen Gruppen an. Ergebnisse von Clusteranalysen werden meist als Dendrogramme („Baumdiagramme“) dargestellt. Es wurde grundsätzlich die Ähnlichkeitsmatrix nach Dice verwendet, daneben noch die nach Jaccard und Raup-Crick, die Euklidische sowie die auf den F_{st} -Werten beruhende Distanzmatrix.

2.6.3.1.1 UPGMA

Mit dem UPGMA-Verfahren („unweighted pairgroup method using arithmetic averages“) „vergleicht man Distanzen von Objekten paarweise und berechnet für die zueinander nächsten Paare die gemeinsame Distanz zu den anderen Objekten mit dem arithmetischen Mittel“ (Wägele 2001). Der UPGMA-Algorithmus wird kritisch gesehen, da er u. a. voraussetzt, dass die berechneten Distanzen ultrametrisch und somit der Divergenzzeit proportional sind. Evolutionsprozesse verlaufen jedoch in der Regel nicht so regelmäßig (Wägele 2001). Dennoch ist die UPGMA das regelmäßig in der Populationsbiologie am meisten angewendete Verfahren. Da auch die wesentlichen Ergebnisse durch andere Algorithmen wie „single linkage“ („nearest neighbor“) unterstützt wurden, wird die UPGMA-Methode auch aus Gründen der Vergleichbarkeit mit anderen Studien in dieser Arbeit verwendet.

2.6.3.2 Hauptkoordinatenanalyse (PCO)

Die Hauptkoordinatenanalyse („Principal Coordinate Analysis“, „PCO“) ist eine gute Möglichkeit, die in einer Distanz- oder Ähnlichkeitsmatrix enthaltene Information der zahlreichen paarweisen Kombinationen auf wenige Dimensionen (meist 2 – 3) zu reduzieren und graphisch darzustellen.

Ausgangspunkt ist eine Vielzahl von Variablen, von denen a-priori nicht bekannt ist, ob und in welcher Weise sie miteinander korreliert sind. Die PCO findet Eigenwerte („eigenvalues“) und Eigenvektoren („eigenvectors“) einer Matrix, die die Distanzen zwischen allen Datenpunkten enthält. Die Werte werden dann in ein zwei- (eben-räumlich) oder dreidimensionales (kubisch-räumlich) Koordinatensystem eingetragen. Die PCO ist auch als „Metrische Multidimensionale Skalierung“ bekannt. Mit Hilfe der Hauptkoordinatenanalyse werden Gruppen von Variablen untersucht, die durch eine „Hintergrundvariable“ charakterisiert werden können. Solche „Hintergrundvariablen“ werden auch Faktoren genannt. Die aus den Variablen abgeleitete Distanz- oder Ähnlichkeitsmatrix ist die Ausgangsbasis für die PCO.

2.6.3.3 Beziehung zwischen Cluster- und ordinativen Methoden wie der PCO

Die Clustermethode und die PCO als Verfahren der multidimensionalen Skalierung (MDS) beruhen beide auf der Verwendung von Ähnlichkeitsmatrizen als „Daten-Input“. Während mit der Clusteranalyse diese Ähnlichkeiten in einen hierarchischen Baum umgesetzt werden, führt die Multidimensionale Skalierung gewissermaßen wieder zu multivariaten Daten zurück, indem sie die Ähnlichkeiten von Objekten (=OTUs) als relative Lagebeziehungen zueinander in einem niedrigdimensionalen Raum darstellt (Kruskal 1977). Die gleichzeitige Anwendung von Clusteranalyse und den Verfahren der Multidimensionalen Skalierung auf dieselben Ähnlichkeitsmatrizen nutzt den weitgehend komplementären Informationsgehalt der Methoden. Bei der iterativen Berechnung der räumlichen Konfiguration der einzelnen Objekte ändert sich bei der MDS die Position der Objekte im Zentrum der Anordnung, wobei diese den Kleinclustern der Clusteranalyse entspricht. Dahingegen verändert sich die relative Lage der Objekte an der Peripherie zum Zentrum hin nicht. Dadurch bleiben die Informationen über große Unähnlichkeiten erhalten. Es kommt als entscheidender Vorteil hinzu, dass die Lagebeziehungen zwischen den Objekten direkt als Abbild der Beziehungen gelten können. Das Erkennen direkter Nachbarschaft oder der Lage zwischen zwei Objekten macht die MDS als Ergänzung zur Clusteranalyse in Studien zur geographischen Variabilität so wertvoll, da sie de facto nicht bestehende Hierarchien, wie sie die Clusteranalyse methodenbedingt immer produzieren muss, z. B. bei klinaler Variation oder Übergangssituationen in Kontakt- oder Hybridisierungszonen, auflöst und gerade den Blick auf solche Situationen lenkt (s. Lessa 1990).

Somit ist die genetische Distanz bei der MDS zwischen allen Einzelobjekten sichtbar und nicht nur zwischen wenigen einzelnen, bevor diese in der hierarchischen Clusteranalyse im Dendrogramm zu einer Gruppe verschmelzen.

2.6.4 Varianzanalyse (AMOVA)

Um die genetische Variabilität innerhalb und zwischen Populationen näher zu beschreiben, wurden Varianzanalysen (AMOVA, Analysis of Molecular Variance) durchgeführt. Hierfür wurde das Softwareprogramm *ARLEQUIN ver. 3.0*, Version Februar 2006 (Excoffier 2005) eingesetzt. Als Datenbasis dient die quadrierte euklidische Distanz D . Die Analyse der molekularen Varianz ist eine Methode, Populationsunterschiede direkt von molekularen Daten aus berechnen und verschiedene Hypothesen in Bezug auf diese Unterschiede testen zu können.

Die Varianz s_x^2 ist die Summe der Abweichungsquadrate (SQ = sum of squares) aller Messwerte einer Verteilung von ihrem Mittelwert, dividiert durch den Freiheitsgrad (n-1):

$$s_x^2 = \frac{SQ}{n-1} = \frac{1}{n-1} \times \sum (x_i - \bar{x})^2$$

n	Stichprobenumfang
$n-1$	Freiheitsgrad
x	Messwert
\bar{x}	arithmetisches Mittel der Messwerte

Die Varianz beschreibt eine Methode zum Prüfen der Nullhypothese mehrerer gleicher Gruppenmittelwerte in der Grundgesamtheit (Gesamtstichprobe). Je größer die Streuung zwischen den Gruppenmittelwerten bzw. je kleiner die Streuung innerhalb der Gruppen ist, desto größer die Vermutung, dass es einen Unterschied der Gruppenmittelwerte in der Grundgesamtheit gibt. Dabei wird die für die Gruppenmittelwerte geschätzte Stichprobenvarianz mit derjenigen innerhalb der Gruppen verglichen. Die Analyse der molekularen Varianz ordnet die genetische Gesamtvariabilität anteilig den einzelnen geographischen Einheiten zu. Es können mehrere Hierarchieebenen unterschieden werden. Zu diesem Zweck können Populationen zu einer übergeordneten Gruppe zusammengefasst werden.

In dieser Untersuchung wurden folgende Ebenen unterschieden:

- Varianz zwischen verschiedenen Populationen innerhalb des Taxons (Interpopulationsebene)
- Varianz innerhalb der Populationen einer Region
- Varianz innerhalb der Populationen (Intrapopulationsebene)

Die Werte für die Varianzkomponenten werden gegen die Nullhypothese, dass im Datensatz keine hierarchische Struktur enthalten ist, auf Signifikanz getestet. Die Nullhypothese wurde durch 1023fache Permutation der Ausgangsdaten generiert.

Das AMOVA-Programm enthält keine Einstellung für die dominant vererbten ISSR- oder RAPD-Marker. Um das Programm auch für solche Marker einsetzen zu können, muss das gleiche Paarungsmuster in allen Populationsstichproben vorausgesetzt werden. Unter dieser Annahme kann man die Analyse mit der Einstellung „RFLP-Marker“ durchführen. Man muss sich der Tatsache bewusst sein, dass jetzt die genotypische Varianz aufgeteilt wird, nicht - wie bei den kodominanten RFLP-Markern üblich - die Varianz von Allelhäufigkeiten. Aus diesem Grund ist es auch nicht empfehlenswert, die hieraus abgeleiteten F-Statistiken mit denen von kodominanten Markern zu vergleichen.

2.6.5 „Maximum Parsimony“ als Baumkonstruktionsverfahren

Das Prinzip der sparsamsten Erklärung ist die Grundlage des „Maximum Parsimony“ - oder kurz MP-Verfahrens. Ziel der Methode ist es, „die kürzeste Topologie zu finden, die zu einer gegebenen Arten / Merkmalsmatrix passt“ (Wägele 2001). Die sparsamste Erklärung beruht auf der Schätzung der Wahrscheinlichkeit, dass die vermutete Übereinstimmung von Merkmalen bei Organismen auf eine gemeinsame Ursache zurückzuführen ist und somit Identitäten in einer gemeinsamen Stammlinie entstanden sind. Es ist „sparsamer“ und daher wahrscheinlicher, wenn die Evolution einer komplizierten Struktur nur einmal stattfand, als dass dieselbe Entwicklung zufällig mehrfach unabhängig abgelaufen ist. Der wahrscheinlichste Stammbaum ist nach dem MP-Verfahren der Baum, der auf der geringsten Anzahl an Merkmalsänderungen beruht und somit am kürzesten ist. Dabei wird jede Merkmalsänderung als 1 Schritt gezählt, die „Baumlänge“ ergibt sich aus der Addition der Schritte für die gesamte Topologie. Im MP-Verfahren werden nur Merkmale gewertet, die bei mindestens 2 Taxa in mindestens 2 Zuständen auftreten („parsimonie-informative Merkmale“, Synapomorphien). Autapomorphien terminaler

Taxa sowie Plesiomorphien, die nur bei einem Außengruppentaxon vorkommen, haben dagegen keine Bedeutung für die Topologie, obwohl sie für die Berechnung der genetischen Distanz und damit der Divergenzzeit wichtig sind. Grundsätzlich ist es möglich, Topologien zu unterscheiden, auch wenn eine Polarisierung oder Wurzelung nicht vorgegeben ist. Durch die Zunahme einer der Innengruppe nahestehenden Außengruppe lässt sich die Polarisierung erreichen und folglich auch eine Lesrichtung der Merkmale. Eine der Voraussetzungen für die Verwendung der „Maximum Parsimony“ ist, dass alle Merkmale entweder dieselbe geschätzte Homologiewahrscheinlichkeit haben oder derart bewertet sind, dass hohe Homologiewahrscheinlichkeiten hoch gewichtet werden (Wägele 2001). Bei der ISSR-Methode wurden keine Gewichtungen unterschiedlicher Art vorgenommen. Eine Berechnung der „sparsamsten“ Topologie ist mittels „effektiver“ Algorithmen nicht möglich (Graham & Foulds 1982). Es sind daher mehrere Schritte nacheinander durchzuführen, um den kürzesten Baum zu finden. In Abhängigkeit vom Umfang des Datensatzes werden dazu unterschiedliche Verfahrensweisen angeboten.

Die Berechnungen für die in dieser Arbeit erstellten Dendrogramme, die auf dem MP-Verfahren beruhen, wurden mit dem Computerprogramm *PAUP** Vers. 4.0b10 (Swofford 2002) durchgeführt. Um die Ergebnisse graphisch umzusetzen, wurde auf das Programm *TREEVIEW* Vers.1.6.6 (Page 2001) zurückgegriffen. Zusätzliche Beschriftungen und Bearbeitungen wurden mit dem Programm *MICROSOFT WORD 2000* vorgenommen.

2.6.5.1 Heuristische Suchalgorithmen

Grundsätzlich gibt es drei Methoden, mit deren Hilfe man in den heute verfügbaren Computerprogrammen die sparsamste Topologie rekonstruieren kann: Die „erschöpfende Suche“, das „branch and bound“-Verfahren und die „heuristische“ Methode. Die „erschöpfende Suche“ („exhaustive search“) und die ihr zuzuordnende „branch and bound-Methode“ gehören zu den exakten Verfahren. Während die „erschöpfende Suche“ ausnahmslos jede mögliche Permutation der Verwandtschaftsbeziehungen überprüft, beschränkt sich der „branch and bound“-Algorithmus auf die Suche nach der sparsamsten Topologie, indem er fortlaufend den Suchvorgang abbricht, sobald eine bestimmte Längenvorgabe überschritten wird und in einer anderen Richtung fortschreibt. Als Längenvorgabe ist hier die Anzahl von Transformationsschritten von Merkmalen zu verstehen. Die „erschöpfende Suche“ ist bei einer Datenmatrix mit mehr als 10-12 terminalen Taxa nicht mehr praktikabel, da die Anzahl der möglichen Bäume dramatisch zunimmt. So sind für $n = 50$ theoretisch schon $2,8 \times 10^{74}$ Bäume möglich und somit mehr Bäume

als Atome im Universum (Storch et al. 2001). Da auf Populationsebene in Größenordnungen über $n = 100$ gearbeitet wurde, kam die „erschöpfende Suche“ nicht in Frage. Das „branch and bound“-Verfahren ist zwar aus oben erwähnten Gründen schneller und verkraftet auch eine höhere Anzahl terminaler Taxa, dennoch erweisen sich beide exakten Methoden für die vorliegende Untersuchung wegen der hohen Zahl terminaler Taxa (50 – 112) als nicht praktikabel.

Abhilfe wird durch die heuristische Suchoption („heuristic search“) geschaffen. Der Ablauf erfolgt in zwei Schritten: Zunächst werden die terminalen Taxa zu einer möglichst sparsamen Topologie zusammengeführt. Häufig geschieht das mit dem „stepwise addition“-Algorithmus: Einem Ausgangsbaum von 3 Taxa werden sukzessive weitere Taxa so hinzugefügt, dass ein optimaler (Teil-)Baum entsteht. Diese sparsame Lösung wird in einem zweiten Schritt in der Suche nach einer noch sparsameren Lösung manipuliert. Das Programm beginnt, Äste zu vertauschen und berechnet, ob sich so ein besserer Baum finden lässt. Für dieses „branch swapping“ gibt es verschiedene Möglichkeiten: Das „TBR“-Verfahren („tree bisection and reconnection“) ist das genaueste, aber auch zeit- und rechenintensivste. Hier wird der Ausgangsbaum in zwei Teile geschnitten und die Teile entlang von Ästen nach dem Zufallsverfahren wieder zusammengefügt. Weitere Optionen sind der „NNI“-Algorithmus („nearest neighbor interchange“), bei dem „nächste Nachbarn“ bezogen auf ein Segment des Stammbaumes ausgetauscht werden und die „SPR“-Methode („subtree pruning and regrafting“), bei der ein Ast abgeschnitten und an anderer Stelle des Ausgangsbaums wieder aufgepfropft wird. Im Gegensatz zur „exakten“- oder einer „branch and bound“-Suche gibt es bei einer heuristischen Suche keine Garantie, dass die erhaltenen Bäume gleicher Länge auch die maximal sparsamsten („most parsimonious“) darstellen. Es kann daher nur von „gleichermaßen sparsamen“ („equally parsimonious“) Kladogrammen gesprochen werden. Grundsätzlich besteht bei der heuristischen Suche, insbesondere bei großen Datenmengen, wie sie bei molekularen Merkmalen auftreten, die Gefahr, dass nur ein lokales Sparsamkeitsmaximum gefunden wird. Um diesen Effekt zu vermeiden, werden die Taxa auf der Basis von Zufall zu einem ersten Kladogramm zusammengefügt („addseq = random“) und dieses nach dem „TBR“-Verfahren behandelt. Alternativ wird auch häufig die Einstellung „addseq = closest“ gewählt, da der Rechenvorgang dann weniger Zeit in Anspruch nimmt. Der Suchprozess wird mehrfach wiederholt, so dass die Taxa auf immer andere Weise zu einem „ersten“ Kladogramm zusammengesetzt werden. Die nachfolgenden Manipulationen erhalten so eine jeweils andere

Ausgangsbasis. Wenn das Ergebnis über mehrfache Replikationen dieses Suchprozesses stabil bleibt, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass eine lokales Sparsamkeitsmaximum vermieden wurde.

2.6.5.2 Konsensumethoden

Oft führt die Analyse einer Datenmatrix zu mehreren gleich sparsamen Kladogrammen. Um ein solches Ergebnis zu visualisieren, wurden verschiedene Konsensumethoden entwickelt. Der „strikte Konsensus“ ist die einfachste Form der Darstellung und resultiert in einer Hierarchie, welche die Schnittmenge aller gefundenen gleich sparsamen Kladogramme wiedergibt. So werden die Abzweigungen, die in allen gleich sparsamen Kladogrammen identisch sind, natürlich auch im strikten Konsensusbaum wiedergegeben. Dagegen treten Taxa, die in den jeweiligen Diagrammen unterschiedliche Lagebeziehungen aufweisen, im strikten Konsensusbaum in einer Trichotomie oder Polytomie auf.

Eine weitere Methode folgt der „50 %-igen Mehrheitsregel“ („50 % majority rule“). Hier wird bewertet, wie oft alternative Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der gleich sparsamen Kladogramme gefunden werden. Dabei werden die Abzweigungen in den Konsensusbaum übernommen, die bei mindestens 50 % der Bäume vorliegen. Somit erhält man gegenüber einem strikten Konsensusbaum einen höheren Grad an Auflösung, da die Wahrscheinlichkeit von Polytomien abnimmt.

2.6.5.3 Bewertung von Kladogrammen

Für den Vergleich und die Bewertung von Kladogrammen sind verschiedene Messwerte entwickelt worden. Entscheidende Basis für alle diese Messwerte ist die Anzahl der Transformationsschritte, die ein berechnetes Kladogramm beinhaltet. Die Länge eines Kladogramms („tree length“) wird durch die absolute Zahl implizierter Transformationsschritte bestimmt. Allerdings eignet sich dieser Wert nur bedingt zum Vergleich phylogenetischer Analysen unterschiedlichen Umfangs, da die Länge eines Kladogramms auch direkt von der Relation der Anzahl Merkmale zur Anzahl terminaler Taxa abhängt.

2.6.5.3.1 Konsistenzindex *CI*

Der Konsistenzindex *CI* („consistency index“) bezogen auf alle Merkmale wird sehr oft im Vergleich phylogenetischer Hypothesen angewandt. Er „bewertet die Zahl der Homoplasien als Anteil der Merkmalsänderungen in einer Topologie“ (Wägele 2001) und berechnet sich wie folgt:

$$CI = M / S$$

<i>CI</i>	Konsistenzindex
<i>M</i>	Summe der geringsten Anzahl von Merkmalsänderungen m_i , die zu erwarten sind.
<i>S</i>	Summe aller in der Topologie gefundenen Merkmalsänderungen s_i .

Der Konsistenzindex ermöglicht einen Vergleich von Datensätzen und Topologien: Wenn in einer Topologie keine Homoplasien vorhanden sind, gilt $CI = 1$. Gibt es Homoplasien, ist die Anzahl der Zustandsänderungen s_i höher als die Mindestanzahl an Änderungen m_i . Als Folge sinkt der Index. Somit gilt: „Je näher der *CI*-Wert bei 1 liegt, desto besser stimmen Topologie und Datensatz überein“ (Wägele 2001).

2.6.5.3.2 Homoplasieindex *HI*

Homoplasien sind Merkmale, deren Auftreten in einem Stammbaum mit anderen Merkmalen nicht kompatibel ist. Ein solch inkompatibles Merkmal kann weder als Homologie noch als Analogie identifiziert werden, solange nicht entschieden ist, welcher Stammbaum als sparsamste Topologie angesehen werden kann. Homoplasien sind letztlich dafür verantwortlich, dass es oftmals zwei oder mehr gleich sparsame Topologien gibt.

Ein dem Konsistenzindex komplementäres Maß ist der Homoplasie-Index *HI*:

$$HI = 1 - CI$$

<i>HI</i>	Homoplasieindex
<i>CI</i>	Konsistenzindex

Der Homoplasieindex *HI* gilt als „Maß für den Anteil an Merkmalsänderungen, der durch Homoplasien verursacht wird“ (Wägele 2001).

Der Konsistenzindex und der mit ihm in Zusammenhang stehende Homoplasieindex haben dieselben Schwächen. Der *CI* wird künstlich erhöht, wenn nicht informative Merkmale („uninformative characters“) wie zum Beispiel Autapomorphien mit berücksichtigt werden. Ein solches Merkmal eines terminalen Taxons hat immer den $c_i = 1$. Somit wird durch zahlreiche Berücksichtigung von Autapomorphien der *CI* in Richtung des Wertes 1 verändert und dementsprechend verfälscht. Analog hierzu wird der *HI* kleiner. Indem die nicht informativen Merkmale ausgeschlossen werden, können sowohl der Konsistenzindex als auch der Homoplasieindex entsprechend korrigiert werden.

2.6.5.3 Konservierungsindex *RI*

Der Konservierungs- oder Retentionsindex *RI* („retention index“) ist „Ausdruck für das Verhältnis von scheinbarer zu tatsächlicher Synapomorphie“ (Rieppel 1999). Er wird wie folgt berechnet:

$$RI = \frac{l_{\max} - S}{l_{\max} - M}$$

l_{\max} maximale Schrittzahl, Summe der Merkmalszustände in der Datenmatrix. Es zählt dabei nur der seltenere Merkmalszustand pro Taxon.

S Anzahl aller implizierten Merkmalsänderungen, bezogen auf die Gesamtheit der Merkmale, einschließlich Apomorphien und Analogien.

M Anzahl der minimal notwendigen Merkmalsänderungen, bezogen auf die Gesamtheit der Merkmale.

S wird um so kleiner, je geringer die Anzahl an Homoplasien ist bzw. je höher die Anzahl an Synapomorphien ist. Da bei der Berechnung der Nenner für einen gegebenen Datensatz konstant ist, wird somit der Konservierungsindex kleiner, je mehr Analogien vorkommen. Im Gegensatz zu dem Konsistenz- und Homoplasieindex wird der Konservierungsindex nicht durch Sympletiomorphien und Autapomorphien beeinflusst, da diese nicht als Homoplasien auftreten können.

2.6.5.3.4 Berichtiger Konsistenzindex *RC*

Das Produkt aus gewöhnlichem Konsistenzindex *CI* und dem Konservierungsindex *RI* ergibt den berichtigen Konsistenzindex *RC* („rescaled consistency index“).

$$RC = CI \times RI$$

Der berichtigte Konsistenzindex soll den Einfluss nicht informativer Merkmale auf den Konsistenzindex minimieren und allgemein zu einer Verbesserung der Vergleichbarkeit phylogenetischer Analysen beitragen. Mit dem Umfang einer Datenmatrix nimmt auch die Homoplasiewahrscheinlichkeit zu, so dass es mit Hilfe des *RC* leichter ist, phylogenetische Analysen bestimmter Taxa mit unterschiedlich großen Datenmengen zu vergleichen (Rieppel 1999).

Keiner der aufgeführten Indizes gibt Auskunft über die Qualität einzelner Merkmale oder bewertet Monophyliehypothesen. Obwohl die Indizes häufig verwendet werden, ist der praktische Nutzen daher eher von untergeordneter Bedeutung.

2.6.5.4 „Bootstrapping“ als statistische Absicherung für MP-Verfahren

Um zu beurteilen, wie vertrauenswürdig oder robust ein Dendrogramm ist, wird oft als Wiederfindungswahrscheinlichkeitstest der Bootstrap-Test („bootstrapping“) eingesetzt. Die „Bootstrap-Werte“ geben in Prozent an, wie oft ein Gabel- oder Knotenpunkt in sämtlichen rekonstruierten Dendrogrammen vorkommt. Dabei wird die ursprüngliche Datenmatrix durch die zufällige Auswahl von Merkmalen in eine modifizierte Datenmatrix umgewandelt. Dabei bleibt zwar die Anzahl der Merkmale konstant, dafür werden andere willkürlich verdoppelt oder bleiben unberücksichtigt. Die so veränderte Datenmatrix wird dem MP-Verfahren unterworfen und daraus ein Dendrogramm berechnet, das mit der ursprünglichen Version verglichen wird. Dieser Vorgang wird 100 bis 1000mal wiederholt. Die Vielzahl an Bäumen wird in einem Mehrheitsregel-Konsensusbaum zusammengefasst. Durch „bootstrapping“ wird der Einfluss der verschiedenen Merkmale auf einen Stammbaum reduziert. Das Ergebnis eines Bootstrap-Tests sollte immer kritisch bewertet werden, da mit den errechneten Prozentzahlen weder die Güte der verwendeten Merkmale noch die Qualität der Stichprobe der gewählten Taxa geschätzt werden kann. Des Weiteren werden dadurch weder das Fehlen von Information noch die Häufung zufälliger Ähnlichkeiten in polyphyletischen Artgruppen erkannt (Wägele 2001). Die

Monophylie einer Gruppe kann im Extremfall durch nur eine einzige gut begründete Synapomorphie gestützt werden, was im „bootstrapping“ (wegen der einen Synapomorphie) nur durch einen sehr niedrigen Prozentwert seinen Niederschlag findet. Hieran wird deutlich, dass der Bootstrap-Test u. a. stark von der Anzahl und Verteilung der Merkmale einer Matrix abhängt. Sämtliche „bootstrap“-Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm *PAUP** Version 4.0b10 (Swofford 2002) durchgeführt.

2.6.6 Manteltest

Der einfache Mantel-Test (Mantel 1967) besteht darin, den Grad und die Signifikanz der Korrelation zwischen zwei Distanzmatrizen, z. B. zwischen genetischer und geographischer, zu bestimmen und zu testen. Der Korrelationswert R_m , oder Mantel- r , ist als Verhältnis aus dem Kreuzprodukt der Matrizen und der Quadratwurzel aus dem Produkt der Summenquadrate der Matrizen definiert.

3. Ergebnisse

3.1 Einzelanalysen der Primer

Die ausgewählten Primer zeigten unterschiedliche Fähigkeiten, Arten und Populationen voneinander zu trennen. Daher ist es sinnvoll, die Primer entsprechend zu gruppieren und die Ergebnisse zu analysieren. Die folgenden Tabellen gruppieren die Primer nach Ihren auflösenden Eigenschaften:

Tab. 3.1: Primer mit Arten- aber ohne Populationsunterscheidung

Primer UBC-Nr.	5' Sequenz 3'	Bemerkungen
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	<i>M. diamina</i> , <i>B. euphrosyne</i> , <i>M. athalia</i> weitgehend trennbar
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	Abtrennung von <i>M. cinxia</i>
862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	Unterscheidung aller Arten möglich
865	CCG CCG CCG CCG CCG CCG	Unterscheidung aller Arten möglich
880	GGA GAG GAG AGG AGA	Trennung <i>M. diamina</i> und <i>M. cinxia</i> von allen anderen

Tab. 3.2: Primer mit geringer Arten- , aber (partieller) Populationsunterscheidung

Primer UBC-Nr.	5' Sequenz 3'	Bemerkungen
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	Keine klaren Trennungen, nur Tendenzen
868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA	Keine klaren Trennungen, nur Tendenzen
878	GGA TGG ATG GAT GGA T	<i>I. lathonia</i> durch mehrere gemeinsame Marker trennbar
884	HBH AGA GAG AGA GAG AG	<i>I. lathonia</i> abtrennbar, kaum Schwerpunktmarker bei Populationen

Erläuterung: H = A oder C oder T (nicht G), B = C oder G oder T (nicht A)

Tab. 3.3: Primer ohne Arten- und ohne Populationsunterscheidung

Primer UBC-Nr.	5' Sequenz 3'	Bemerkungen
825	ACA CAC ACA CAC ACA AG	Polymorph, aber keine klaren Trennungen
855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	Polymorph, aber keine klaren Trennungen

Häufig erschließt sich dem Bearbeiter beim Anblick der gewonnenen Datenmatrix aufgrund des vorliegenden sehr hohen Polymorphismus nicht die Wertigkeit eines bestimmten Primers. Die Wertigkeit sei hier definiert als die Fähigkeit, verschiedene Taxa (Arten oder Populationen) voneinander trennen zu können. Als sehr hilfreich hat sich für eine solche Beurteilung die Hauptkoordinatenanalyse erwiesen, da mit ihrer Hilfe Unterschiede zwischen den zu analysierenden Taxa sichtbar gemacht werden können.

Bei den folgenden primerbezogenen Ergebnistabellen werden die Vergleichsarten *M. diamina*,

M. cinxia, *M. aurelia*, *B. euphrosyne* und *I. lathonia* nicht nach Populationen unterschieden – während bei *M. athalia* verschiedene Fundorte populationsgemäß zusammengefasst worden sind. Um die Vergleichbarkeit mit den anderen Arten möglich zu machen, werden in der letzten Zeile alle *M. athalia*-Stichproben zusammen behandelt. In der dritten Spalte ist die Anzahl der jeweils untersuchten Individuen aufgeführt, darauf folgt die Spannbreite der gefundenen Fragmente in Anzahl Basenpaaren („bp“). Die Bezeichnung „% p B“ bezieht sich auf den Anteil polymorpher Banden in Prozent. Des Weiteren werden zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien die Gendiversität h nach Nei (Nei 1973) sowie der Shannon-Index I (Shannon & Weaver 1949) mit ihren Standardabweichungen (in Klammern) angegeben.

3.1.1 Artentrennende Primer

3.1.1.1 Primer UBC-808

Primer UBC-808 amplifiziert Fragmente in der Größe von 4000 bis 400 bp, allein für *M. athalia* konnten 56 verschiedene Marker festgestellt werden. Der Polymorphismus ist sehr hoch, unabhängig von Arten oder Populationen erreicht er Werte zwischen 90 und 100 %. Dass sich bei *M. aurelia* mit 77,8 % die niedrigste Rate findet, ist sicherlich mit der geringen Stichprobengröße zu begründen. Interessanterweise findet man aber auch monomorphe Marker. Darunter sind Marker zu verstehen, die in allen untersuchten Proben, die zusammengehören, amplifiziert werden. Diese sind durchaus auch als diagnostische Merkmale zu werten: Bei 11 von 12 *M. diamina* (= 91,7 %) findet sich der Marker 1450 bp, bei allen *B. euphrosyne* findet sich der Marker 720 bp. Die Taxa *M. cinxia* und *I. lathonia* weisen keinen monomorphen Marker auf. Auffallend ist für *M. athalia* der Marker 1130, der sich bei 94,3 % der *M. athalia*-Gesamtstichprobe nachweisen lässt, aber bei allen anderen Taxa fehlt. Nur bei den beiden ostdeutschen Populationen tritt ein weiterer Marker (1030 bp) in den Vordergrund. Dieser ist nur dort monomorph, während es hier Tiere gibt, denen der Marker 1130 fehlt.

Ansonsten zeigen die *M. athalia*-Populationen keine diagnostischen Unterschiede. Auch bei *M. athalia* finden sich Marker in der Größe von 1450 bp (s. *M. diamina*) oder 720 bp (s. *B. euphrosyne*). Es handelt sich dabei nur um wenige Einzelexemplare, wobei die Homologie dieser gleichgroßen Fragmente fraglich bleibt.

Tab. 3.4: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-808

Taxon	Populationen	n	Fragmente bp	Anzahl Banden	Anzahl polymorpher Banden	% p B	spezifische Fragmente bp	„gene diversity“ h (Nei 1973)	Shannon's Diversitätsindex I
<i>lathonia</i>	divers	5	2800 - 480	15	15	100	-	0,2801 (0,1240)	0,4445 (0,1442)
<i>euphrosyne</i>	divers	5	3200 - 460	27	26	96,43	720 (100%)	0,2772 (0,1368)	0,4365 (0,1690)
<i>cinxia</i>	Brandenburg	4	1900 - 460	13	13	100	-	0,3837 (0,1285)	0,5644 (0,1438)
<i>diamina</i>	divers	12	3200 - 600	22	22	100	1450 (91,7%)	0,1920 (0,1064)	0,3315 (0,1369)
<i>aurelia</i>	Eifel	2	2400 - 830	9	7	77,78	2400 (100%) 1900 (100%)	0,3222 (0,1827)	0,4703 (0,2667)
<i>athalia</i>	Eifel	8	4000 - 600	22	21	95,45	1130 (100%)	0,1941 (0,1087)	0,3321 (0,1473)
<i>athalia</i>	Fichtelberg (Sachsen)	29	3400 - 400	44	42	95,45	1130 (100%) 1030 (100%)	0,1454 (0,1065)	0,2606 (0,1521)
<i>athalia</i>	Brandenburg	8	2900 - 400	28	27	96,43	1030 (100%)	0,2254 (0,1560)	0,3658 (0,1959)
<i>athalia</i>	Polen (Ost)	15	3400 - 480	41	41	100	1130 (93,33%)	0,2351 (0,1505)	0,3789 (0,1928)
<i>athalia</i>	Finnland	4	2900 - 400	20	20	100	-	0,3446 (0,1196)	0,5214 (0,1347)
<i>athalia</i>	Vorarlberg	10	2900 - 400	28	27	96,43	1130 (100%)	0,2353 (0,1210)	0,3851 (0,1584)
<i>athalia</i>	Südtirol	36	3200 - 400	41	40	97,56	1130 (100%)	0,1310 (0,1117)	0,2378 (0,1570)
<i>athalia</i>	Wallis	24	3000 - 600	26	25	96,15	1130 (100%)	0,1417 (0,1224)	0,2510 (0,1723)
<i>athalia</i>	Ligurien	5	3200 - 830	13	12	92,31	1130 (100%)	0,3109 (0,1491)	0,4726 (0,1959)
<i>athalia</i>	Südfrankreich (gesamt)	24	3200 - 400	41	41	100	1130 (95,83%)	0,1389 (0,1065)	0,2514 (0,1512)
<i>athalia</i>	Peira Cava/ Lucéram Südfrankreich	7	3200 - 400	31	30	96,77	1130 (100%)	0,2194 (0,1188)	0,3653 (0,1529)
<i>athalia</i>	Tende Südfrankreich	7	1900 - 530	11	10	90,91	1130 (100%) 1030, 830, 530 (85,7%)	0,2905 (0,1817)	0,4408 (0,2358)
<i>athalia</i>	St.Martin Vs. Südfrankreich	10	2500 - 530	25	25	100	1130 (80%)	0,2068 (0,1137)	0,3498 (0,1473)
<i>athalia</i>	alle Populationen zusammen	164	4000 - 400	56	56	100	1130 (96,34%)	0,1155 (0,0934)	0,2172 (0,1369)

Erläuterung: n = Anzahl untersuchter Individuen, bp = Basenpaare, Fragmente = amplifizierte DNA, % p B = Anteil polymorpher Banden in Prozent, spezifische Fragmente: Fragmente, die in einem auffallend hohen Anteil der Tiere des jeweiligen Taxons oder der Population vorhanden sind. Die Fragmente werden wieder in Anzahl Basenpaaren („bp“) charakterisiert. Hinter der Basenpaarangabe befindet sich in Klammern der prozentuale Anteil der Tiere, bei denen das entsprechende Fragment amplifiziert wurde. Bei den Kennzahlen „gene diversity“ h (Nei 1973) und dem Diversitätsindex I nach Shannon werden zusätzlich zu den Werten darunter die Standardabweichungen in Klammern angegeben.

3.1.1.2 Primer UBC-818

Die Fragmentgrößen lagen zwischen 4000 und 400 bp. Die Polymorphismusrate betrug bis auf wenige Ausnahmen 100%. Bei der Abgrenzung von *M. athalia* zu anderen Arten ergaben sich bei Primer 818 nur wenige interessante Marker. Alle *M. cinxia*-Proben wiesen die Bande 980 bp auf, die hier als artspezifisch gelten kann. *I. lathonia* zeigt zwei monomorphe Marker, die sich jedoch grundsätzlich auch bei anderen Arten finden. Verschiedene *M. athalia*-Populationen zeigen ebenfalls Anhäufungen bestimmter Marker. Dennoch ist eine Unterscheidung der Populationen nicht möglich (Tabelle 3.5).

Tab. 3.5: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-818

Taxon	Populationen	n	Fragmente bp	Anzahl Banden	Anzahl polymorpher Banden	% p B	spezifische Fragmente (Anteil in %)	„gene diversity“ h (Nei 1973)	Shannon's Diversitätsindex I
<i>lathonia</i>	divers	5	2100 – 480	9	7	77,78	2100, 1550 (100%)	0,2422 (0,1909)	0,3724 (0,2609)
<i>euphrosyne</i>	divers	5	3100 – 670	18	18	100	1050 (80%)	0,2415 (0,928)	0,4003 (0,1099)
<i>cinxia</i>	Brandenburg	4	2700 – 590	9	8	88,89	980 (100%)	0,3575 (0,1513)	0,5239 (0,2119)
<i>diamina</i>	divers	12	4000 – 480	21	21	100	1100 (83,33%)	0,2557 (0,1492)	0,4068 (0,1885)
<i>athalia</i>	Eifel	8	3250 – 900	18	18	100	-	0,2835 (0,1199)	0,4480 (0,1463)
<i>athalia</i>	Fichtelberg (Sachsen)	39	3500 – 420	31	31	100	-	0,1748 (0,1256)	0,3019 (0,1665)
<i>athalia</i>	Brandenburg	8	3250 – 740	19	19	100	-	0,2025 (0,1094)	0,3455 (0,1394)
<i>athalia</i>	Polen (Ost)	15	2800 - 690	24	24	100	2050 (86,67%)	0,2475 (0,1465)	0,3972 (0,1832)
<i>athalia</i>	Finnland	4	3500 – 740	18	18	100	-	0,3273 (0,1132)	0,5023 (0,1282)
<i>athalia</i>	Vorarlberg, Liechtenstein	18	3800 – 420	33	33	100	-	0,2041 (0,1438)	0,3379 (0,1901)
<i>athalia</i>	Südtirol	27	3500 – 600	20	20	100	1800 (85,12%)	0,1965 (0,1352)	0,3289 (0,1831)
<i>athalia</i>	Wallis	25	2800 – 520	33	33	100	-	0,2156 (0,1343)	0,3562 (0,1762)
<i>athalia</i>	Ligurien	5	2800 - 400	22	21	95,45	860 (100%)	0,3001 (0,1293)	0,4646 (0,1655)
<i>athalia</i>	Südfrankreich (gesamt)	25	3500 – 520	30	30	100	-	0,1900 (0,1307)	0,3207 (0,1780)
<i>athalia</i>	Peira Cava, Lucéram Südfrankreich	8	3500 - 740	24	24	100	2100 (87,5%)	0,2507 (0,1284)	0,4057 (0,1578)
<i>athalia</i>	Tende Südfrankreich	7	2800 – 790	15	14	93,33	2050 (100%)	0,3321 (0,1566)	0,4960 (0,2050)
<i>athalia</i>	St.Martin Vs. Südfrankreich	10	2800 – 520	20	20	100	-	0,2143 (0,1168)	0,3598 (0,1489)
<i>athalia</i>	alle Populationen zusammen	166	3800 – 400	43	43	100	-	0,1402 (0,1206)	0,2481 (0,1729)

Erläuterung s. Tab. 3.4

3.1.1.3 Primer UBC-862

Die Größe der von Primer 862 produzierten Fragmente variiert von 3000 bis 300 bp. Das Fragment bestehend aus 670 bp fällt besonders auf: Es ist ausnahmslos bei allen *M. athalia*-Individuen vorhanden, aber dennoch nicht artspezifisch, da es auch bei allen *M. diamina* sowie einigen *B. euphrosyne*-Proben nachgewiesen werden konnte. Bei den Taxa *I. lathonia*, *B. euphrosyne* und *M. cinxia* fallen mehrere monomorphe Banden auf, so dass sich der Primer 862 in Kombination mit diesen monomorphen Markern in vielen Fällen zur Artunterscheidung eignet. Eine Trennung der verschiedenen *M. athalia*-Populationen ist jedoch nicht möglich, obwohl manche Marker in bestimmten Populationen häufiger auftreten. So findet sich der Marker 520 bp bei allen Proben aus Brandenburg, Polen, Vorarlberg und bei 27 von 28 Tieren (=96,4 %) vom Fichtelberg. In Vorarlberg ist zudem noch Marker 1250 bp bei allen Proben nachgewiesen, die finnischen Tiere fallen durch die Marker 1600 und 1100 auf. Die Polymorphismusrate erreicht bei keinem Taxon und keiner Population die 100 % (Tabelle 3.6).

Tab. 3.6: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-862

Taxon	Populationen	n	Frag- mente bp	Anzahl Banden	Anzahl poly- morpher Banden	% p B	spezifische Fragmente	„gene diversity” h (Nei 1973)	Shannon´s Diversitäts- index I
<i>lathonia</i>	divers	5	1800 – 460	17	13	72,22	1600, 1060, 840, 460 (100%)	0,2027 (0,1591)	0,3228 (0,2332)
<i>euphro- syne</i>	divers	5	2200 – 340	20	17	85,0	1500, 1250, 890 (100%)	0,2595 (0,1677)	0,4022 (0,2255)
<i>cinxia</i>	Brandenburg	4	2300 – 340	22	19	86,36	550, 500, 340 (100%)	0,2374 (0,1258)	0,3825 (0,1807)
<i>diamina</i>	divers	12	1900 – 340	22	21	95,45	670 (100%) 1000 (91%)	0,2634 (0,1791)	0,4078 (0,2289)
<i>aurelia</i>	Eifel	2	1400 – 670	4	1	25,0	1400, 1150, 670 (100%)	0,1036 (0,2071)	0,1512 (0,3024)
<i>athalia</i>	Eifel	8	2100 – 400	14	13	92,86	670 (100%)	0,2151 (0,1300)	0,3552 (0,1774)
<i>athalia</i>	Fichtelberg (Sachsen)	28	3000 - 460	35	34	97,14	670 (100%) 570, 520 (96,43%)	0,1576 (0,1379)	0,2706 (0,1912)
<i>athalia</i>	Brandenburg	6	2200 – 520	17	16	94,12	670 (100%) 1400, 570, 520 (83,3%)	0,2878 (0,1584)	0,4440 (0,2013)
<i>athalia</i>	Polen (Ost)	15	2400 - 400	27	25	92,59	670, 520 (100%) 570 (93,3%)	0,2402 (0,1536)	0,3826 (0,2035)
<i>athalia</i>	Finnland	4	2600 – 490	17	13	76,47	1600, 1100, 670, 570 (100%)	0,3048 (0,1955)	0,4460 (0,2738)
<i>athalia</i>	Vorarlberg	10	2300 – 300	30	29	96,67	670 (100%) 1250, 520 (90%)	0,2027 (0,1231)	0,3414 (0,1622)
<i>athalia</i>	Südtirol	34	2300 – 320	32	31	96,88	670 (100%)	0,1312 (0,1491)	0,2289 (0,1982)
<i>athalia</i>	Wallis	22	2400 – 300	27	26	96,3	670 (100%)	0,1880 (0,1425)	0,3149 (0,1916)
<i>athalia</i>	Ligurien	5	2800 – 460	21	19	90,48	670, 570 (100%)	0,2796 (0,1582)	0,4320 (0,2067)
<i>athalia</i>	Südfrankreich (gesamt)	25	2300 – 380	37	36	97,3	670 (100%)	0,1138 (0,1015)	0,2140 (0,1416)
<i>athalia</i>	Peira Cava Lucéram Südfrankreich	8	2300 - 380	28	27	96,43	670 (100%)	0,2474 (0,1255)	0,4000 (0,1626)
<i>athalia</i>	Tende Südfrankreich	7	2050 – 670	6	4	66,67	950, 670 (100%)	0,1470 (0,1720)	0,2427 (0,2433)
<i>athalia</i>	St.Martin Vs. Südfrankreich	10	2100 – 520	18	17	94,44	670 (100%)	0,1781 (0,1152)	0,3084 (0,1554)
<i>athalia</i>	alle Populationen	157	3000 – 300	59	58	98,31	670 (100%)	0,0967 (0,1144)	0,1791 (0,1654)

Erläuterung s. Tab 3.4

3.1.1.4 Primer UBC-865

Bei Primer 865 führte die zusätzliche Verwendung von „Q-Solution“ der Firma Qiagen zusammen mit der Erhöhung der Annealing-Temperatur auf 51,5 °C sowie gleichzeitiger Erhöhung der eingesetzten DNA-Menge von 1 µl auf 1,5 µl zur Optimierung der PCR-Bedingungen (s. 2.5.4).

Es fällt auf, dass die Polymorphismuswerte bei diesem Primer ebenso wie beim Primer 862 durchgehend unter 100 % bleiben und somit deutlich niedriger sind als bei den anderen Primern. Die Fragmentgrößen liegen zwischen 3800 und 550 bp. Durch das überschaubarere Bandenmuster ist die Möglichkeit gegeben, Taxa voneinander zu unterscheiden (s. Abbildung 2.14). Bei *M. diamina* z. B. sind gleich 4 Marker zu 100 % vorhanden (1850 bp, 1500 bp, 850 bp und 780 bp). Dennoch ist keiner der Marker absolut artspezifisch, da sie – wenn auch nur äußerst selten – auch bei anderen Taxa vorkommen. Kombiniert man nur 3 dieser 4 Primer miteinander, so reicht das aus, um *M. diamina* zu identifizieren. Die Kombination von 1500 bp und 1850 bp könnte dagegen *M. diamina* und *B. euphrosyne* nicht unterscheiden, da alle Tiere der beiden Arten diese Marker zeigen. *M. cinxia* lässt sich über den artspezifischen Marker 1675 bp charakterisieren. Von *M. athalia* wurden 143 Proben untersucht. Dabei ergaben sich für vier Marker sehr hohe Anteile: 2200 bp: 94,1 %, 1190 bp: 97,2 %, 1100 bp: 85,3 % und 1000 bp: 95,8%. Andererseits kamen diese Marker auch vereinzelt bei den anderen Taxa vor, insbesondere bei *M. aurelia* - der Art, die von allen überprüften als die nächstverwandte von *M. athalia* gilt - so dass eine Spezifität wiederum nur über die Kombination möglichst aller vier Marker erreicht wird. Ein populationsspezifischer Marker konnte nicht festgestellt werden (Tabelle 3.7).

Tab. 3.7: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-865

Erläuterung s. Tab. 3.4

Taxon	Populationen	n	Fragmente bp	Anzahl Banden	Anzahl polymorpher Banden	% p B	spezifische Fragmente (Anteil in %)	„gene diversity“ h (Nei 1973)	Shannon's Diversitätsindex I
<i>lathonia</i>	divers	5	3000 - 800	13	6	46,15	1900, 1550, 1300, 1130, 1030, 900, 800 (100%)	0,1353 (0,1725)	0,2128 (0,2573)
<i>euphrosyne</i>	divers	5	3800 - 780	18	15	83,33	1850, 1650, 1230 (100%)	0,2083 (0,1282)	0,3424 (0,1875)
<i>cinxia</i>	Brandenburg	4	3600 - 950	9	7	77,78	1800, 1675 (100%)	0,3103 (0,2044)	0,4530 (0,2821)
<i>diamina</i>	divers	12	3500 - 780	21	17	80,95	1850, 1500, 850, 780 (100%)	0,1623 (0,1466)	0,2731 (0,2058)
<i>aurelia</i>	Eifel	3	2400 - 900	15	13	86,67	1900, 1550 (100%)	0,3476 (0,1677)	0,5085 (0,2286)
<i>athalia</i>	Fichtelberg (Sachsen)	36	3400 - 780	27	24	88,89	2200, 1600, 1190, 1100 (je 100%) 1000 (94,5%)	0,1807 (0,1564)	0,2964 (0,2190)
<i>athalia</i>	Brandenburg	5	3000 - 900	17	13	76,47	1380, 1190, 1000, 900 (je 100%) 3000, 2200, 1100 (80%)	0,2916 (0,1977)	0,4297 (0,2746)
<i>athalia</i>	Polen (Ost)	15	3400 - 900	22	20	90,91	1380, 1190 (je 100%) 1000 (93,3%) 1100 (86,7%)	0,2187 (0,1538)	0,3529 (0,2088)
<i>athalia</i>	Finnland	4	3000 - 780	15	13	86,67	1190, 1000 (100%)	0,3033 (0,1647)	0,4574 (0,2230)
<i>athalia</i>	Vorarlberg, Liechtenstein	18	3400 - 550	19	18	95,83	1000 (100%) 1190 (94,5%) 1600, 1100 (88,89%)	0,2684 (0,1543)	0,4198 (0,1999)
<i>athalia</i>	Südtirol	10	3400 - 780	26	24	92,31	2100, 1000 (je 100%) 1190 (90%)	0,2423 (0,1507)	0,3857 (0,2014)
<i>athalia</i>	Wallis	25	3600 - 700	27	24	88,89	2200, 1100, 1000 (100%)	0,1949 (0,1585)	0,3181 (0,2156)
<i>athalia</i>	Ligurien	5	3000 - 900	17	14	82,35	1600, 1190, 1000 (100%)	0,2608 (0,1773)	0,4003 (0,2403)
<i>athalia</i>	Südfrankreich (gesamt)	25	3500 - 700	28	25	89,29	2200, 1380, 1000 (100%) 1190 (96%)	0,1769 (0,1470)	0,2946 (0,2065)
<i>athalia</i>	Peira Cava, Luzéram Südfrankreich	8	3400 - 900	23	19	82,61	2200, 1380, 1190, 1000 (100%)	0,2554 (0,1829)	0,3910 (0,2482)
<i>athalia</i>	Tende Südfrankreich	7	3400 - 850	15	10	66,67	2200, 1380, 1190, 1100, 1000 (100%)	0,1785 (0,1670)	0,2852 (0,2242)
<i>athalia</i>	St.Martin Vs. Südfrankreich	10	3500 - 700	20	16	80	2200, 1600, 1380, 1000 (100%)	0,1644 (0,1461)	0,2758 (0,2073)
<i>athalia</i>	alle Populationen zusammen	143	3600 - 550	41	41	100	2200 (94,1%) 1190 (97,2%) 1000 (95,8%) 1100 (85,3%)	0,1569 (0,1432)	0,2677 (0,1975)

3.1.1.4.1 Clusteranalyse bei UBC-865

Für die Clusteranalyse wurden verschiedene Distanzmaße zugrunde gelegt und verglichen. Die Berechnung der Dendrogramme wurde mit der UPGMA-Methode durchgeführt. Bei allen überprüften Distanzmaßen – Dice-, Jaccard-, Raup-Crick-Index und euklidische Distanz – ließen sich die Arten in Cluster trennen. Unterschiede gab es in der Stellung zueinander. Das Dendrogramm in Abb. 3.1 beruht auf dem Dice-Index. Da sämtliche *M. athalia*-Individuen zusammenclustern, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit beispielhaft nur ein Teil der *M. athalia*-Gruppe (Population Fichtelberg, n = 25) aus Ostdeutschland ausgewählt.

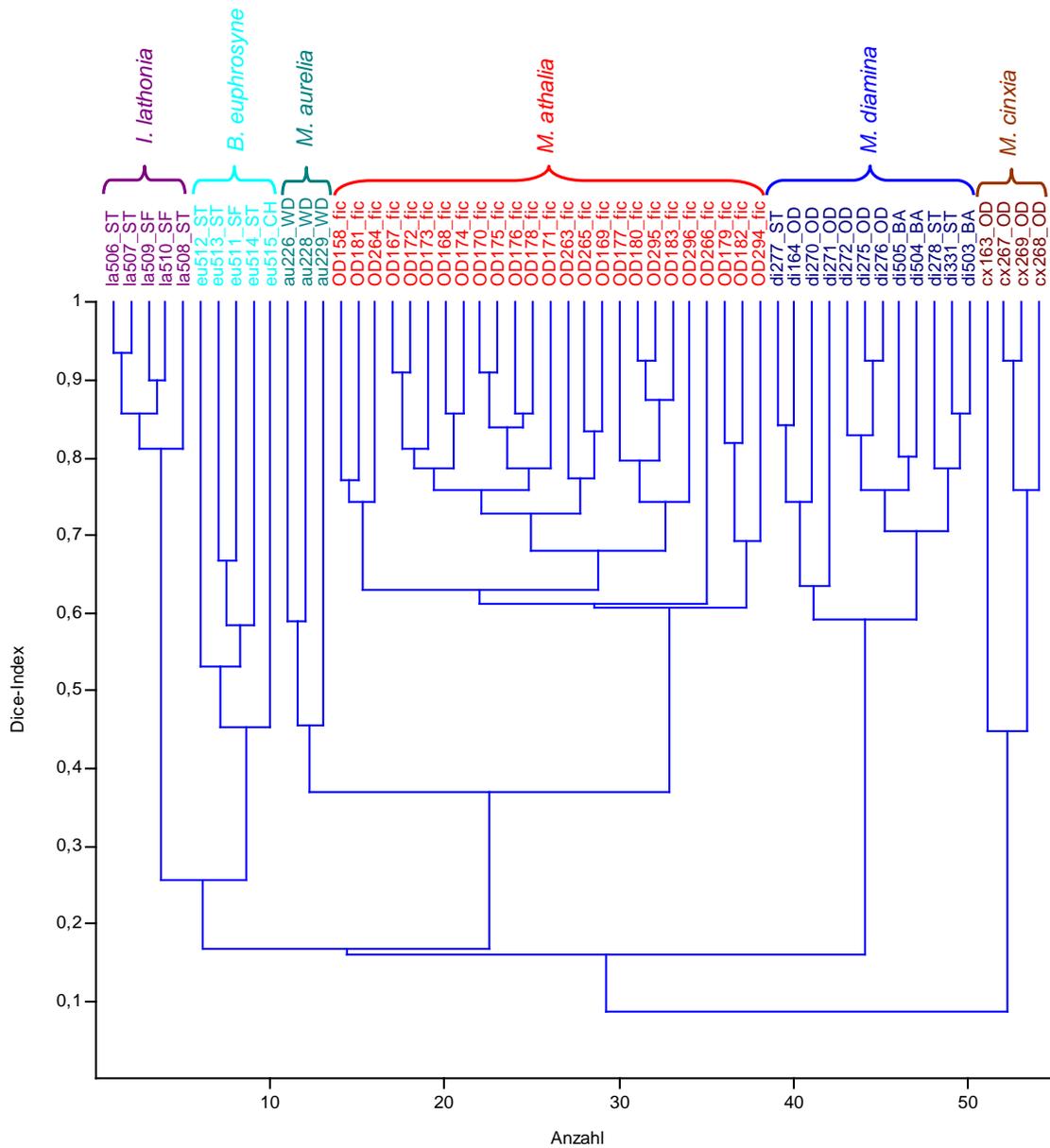


Abb. 3.1: UPGMA-Dendrogramm für den Primer UBC-865 auf Basis des Dice-Index.

Den Berechnungen liegen die Marker zugrunde, die mit Hilfe des UBC-Primers 865 gewonnen wurden.

Zeichenerklärung: **la** = *I. lathonia*, **eu** = *B. euphrosyne*, **au** = *M. aurelia*, **OD...fic** = *M. athalia*-Population Fichtelberg, **di** = *M. diamina*, **cx** = *M. cinxia*. Die Ziffern geben die Nummern der Individuen an; die Großbuchstaben beziehen sich auf die Fundgebiete: BA = Bayern, CH = Schweiz, OD = Ostdeutschland, ST = Südtirol, SF = Südfrankreich, WD = Westdeutschland.

3.1.1.4.2 Hauptkoordinatenanalyse bei UBC-865

Es wurde eine Hauptkoordinatenanalyse (PCO) (s. 2.6.3.2) durchgeführt und zwei Eigenvektoren in ein Diagramm eingetragen. Um die Abgrenzung deutlicher zu machen, wurden die äußeren Punkte durch Geraden verbunden. Auch hier werden die artlichen Unterschiede deutlich. Die *M. athalia*-Populationen sind nicht zu trennen und bilden eine separate „Wolke“. Die PCO-Analysen beruhen auf den Ähnlichkeitswerten nach Dice, Jaccard und Raup-Crick. Die letztere trennt die verschiedenen Taxa noch deutlicher und konzentriert die *M. athalia*-Gruppe stärker. Da die Ergebnisse der PCOs auf Basis des Dice- und des Jaccard-Index praktisch austauschbar sind, wird auf die Darstellung der „Jaccard-PCO“ verzichtet.

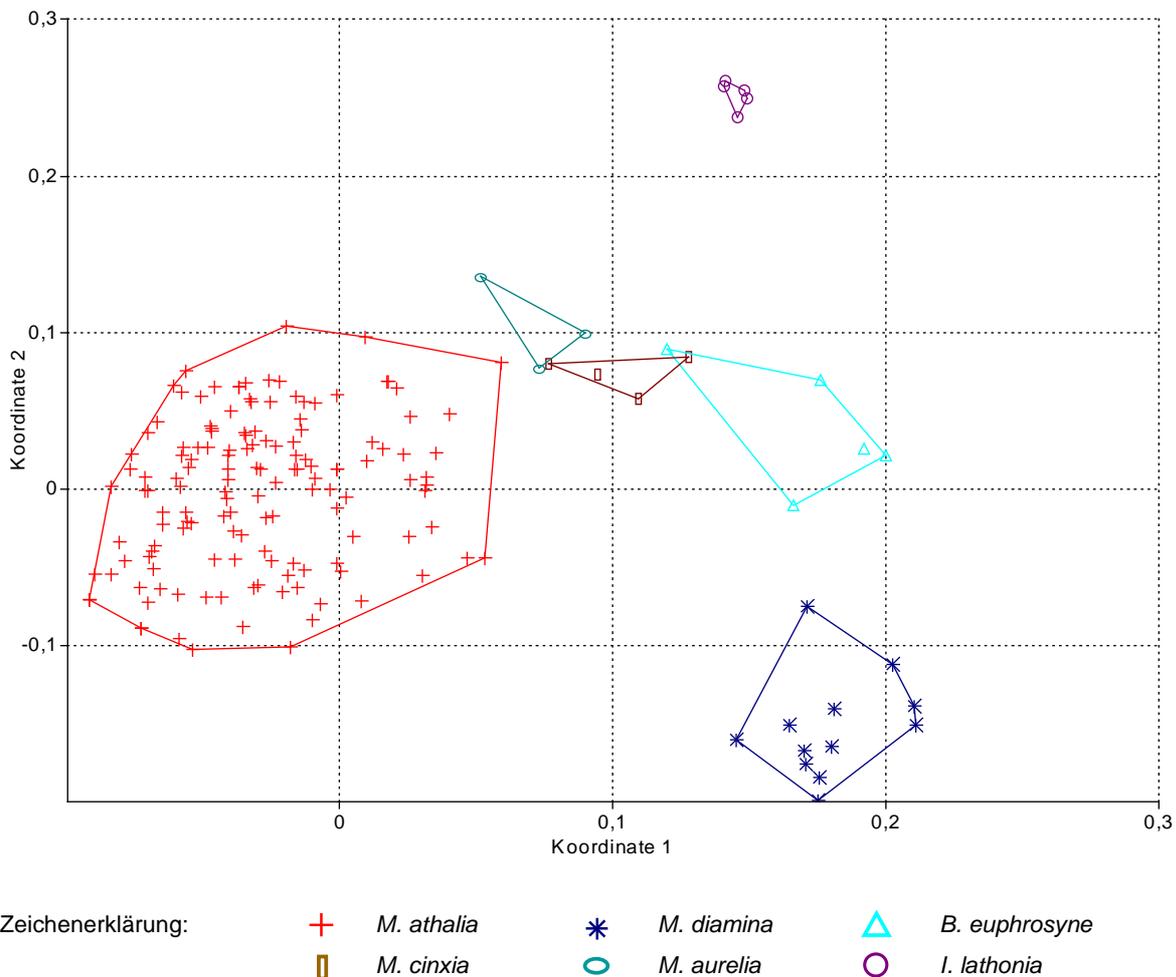


Abb. 3.2: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse für Primer UBC-865 nach Dice

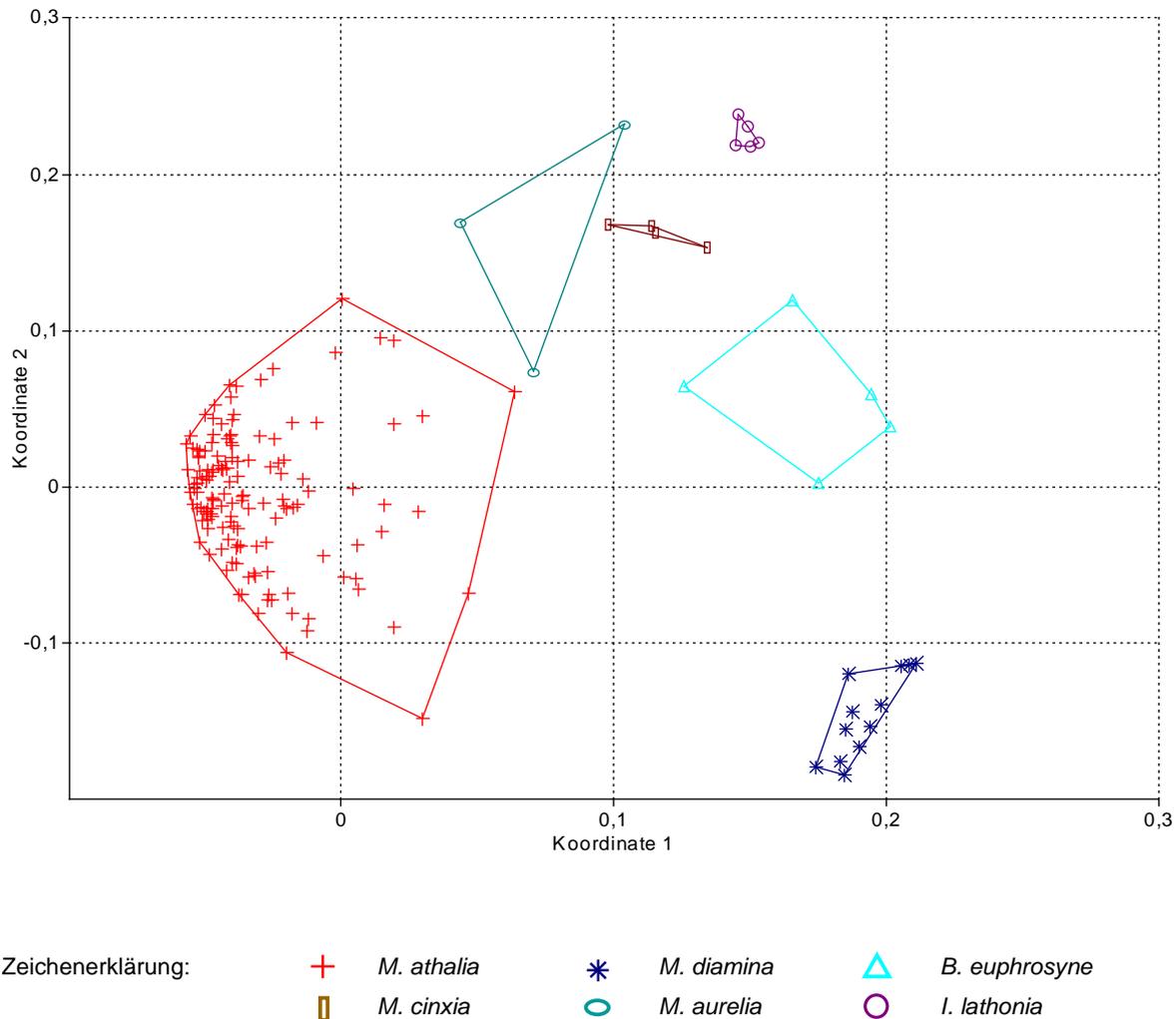


Abb. 3.3: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse für Primer UBC-865 nach Raup-Crick

In den Graphiken (Abb. 3.2 und Abb. 3.3) werden die 173 untersuchten Individuen aus 4 Arten des Tribus Melitaeini sowie 2 Arten des Tribus Agynnini in 6 Gruppen angeordnet. Die *M. athalia*-Populationen sind nicht zu unterscheiden und werden einheitlich in Rot dargestellt.

Die Gesamtstichprobe setzt sich zusammen aus: *M. diamina* (n = 12), *M. cinxia* (n = 4), *M. aurelia* (n = 3), *M. athalia* (n = 143), *I. lathonia* (n = 5), *B. euphrosyne* (n = 5).

Tabelle 3.8 gibt die jeweiligen Eigenwerte (1 – 4) und Varianzen für die beiden ausgewählten Ähnlichkeitsindizes wieder.

Tab. 3.8: Eigenwerte und Varianzen der Hauptkomponentenanalyse auf Basis der Ähnlichkeitsindizes nach Dice und Raup-Crick bei Primer UBC-865
(Transformationsexponent jeweils $c = 1$)

	Dice		Jaccard		Raup-Crick	
	Wert	% Varianz	Wert	% Varianz	Wert	% Varianz
Eigenwert 1	16,46	18,25	13,99	12,39	25,28	14,16
Eigenwert 2	7,39	8,20	6,55	5,80	9,83	5,44
Eigenwert 3	5,98	6,63	5,53	4,90	7,87	4,36
Eigenwert 4	4,85	5,38	4,97	4,40	6,85	3,79

3.1.1.4.3 Verwandtschaftsbaumkonstruktion durch „Maximum Parsimony“

Unter Verwendung des Computerprogramms „PAUP*“ Version 4.0b10. (Swofford 2002) wurde versucht, mittels des „Maximum Parsimony“-Verfahrens die kürzeste Topologie zu finden, die zu der vorliegenden Datenmatrix passt. Hierfür wurde eine heuristische Suche durchgeführt, die auf 300000 Bäume beschränkt wurde. Die gleich kurzen Bäume hatten eine Länge von 160 Schritten. Daher wurden aus den gleich „sparsamen“ Topologien ein strikter sowie ein „50 %-majority-rule“ Konsensusbaum berechnet. Als Außengruppe und somit zur Wurzelung des Baumes dienen die 5 Individuen von *I. lathonia*.

Betrachtet man zunächst den strikten Konsensusbaum (Abb. 3.4), gibt es innerhalb der Arten auf Individuenebenen nur bei *M. athalia* einige wenige dichotome Aufspaltungen. Während *M. athalia*, *B. euphrosyne* und *M. diamina* monophyletisch sind, finden sich bei *M. aurelia* und *M. cinxia* Polytomien. Dennoch können zwei übergeordnete Gruppen nachgewiesen werden, bestehend aus *M. aurelia* und *M. athalia* auf der einen sowie *M. cinxia*, *B. euphrosyne* und *M. diamina* auf der anderen Seite. Dass der Perlmutterfalter *B. euphrosyne* als Schwestergruppe von *M. diamina* ausgewiesen wird, zeigt, wie problematisch es sein kann, wenn ein Taxon als Innengruppe behandelt wird, welches eigentlich nur als Außengruppe in Frage kommt. Gleichzeitig wird damit dokumentiert, dass die Aussagekraft einer Datenmatrix, die sich nur auf die Ergebnisse eines einzigen Primers stützt, begrenzt ist. Betrachtet man nur die Melitaea-Arten, so erweisen sich *M. diamina* und *M. cinxia* sowie *M. athalia* und *M. aurelia* als Schwestergruppentaxa, was der allgemein anerkannten Taxonomie entspricht.

Der „50 %-majority-rule“ Konsensusbaum (Abb. 3.5) setzt sich ausschließlich aus solchen Verzweigungen zusammen, die in mindestens 50 % der berechneten Topologien nachgewiesen werden. Wiederum wird die Trennung der Taxa bestätigt. Zwei Individuen von *M. aurelia* bilden eine basale Gruppe aus.

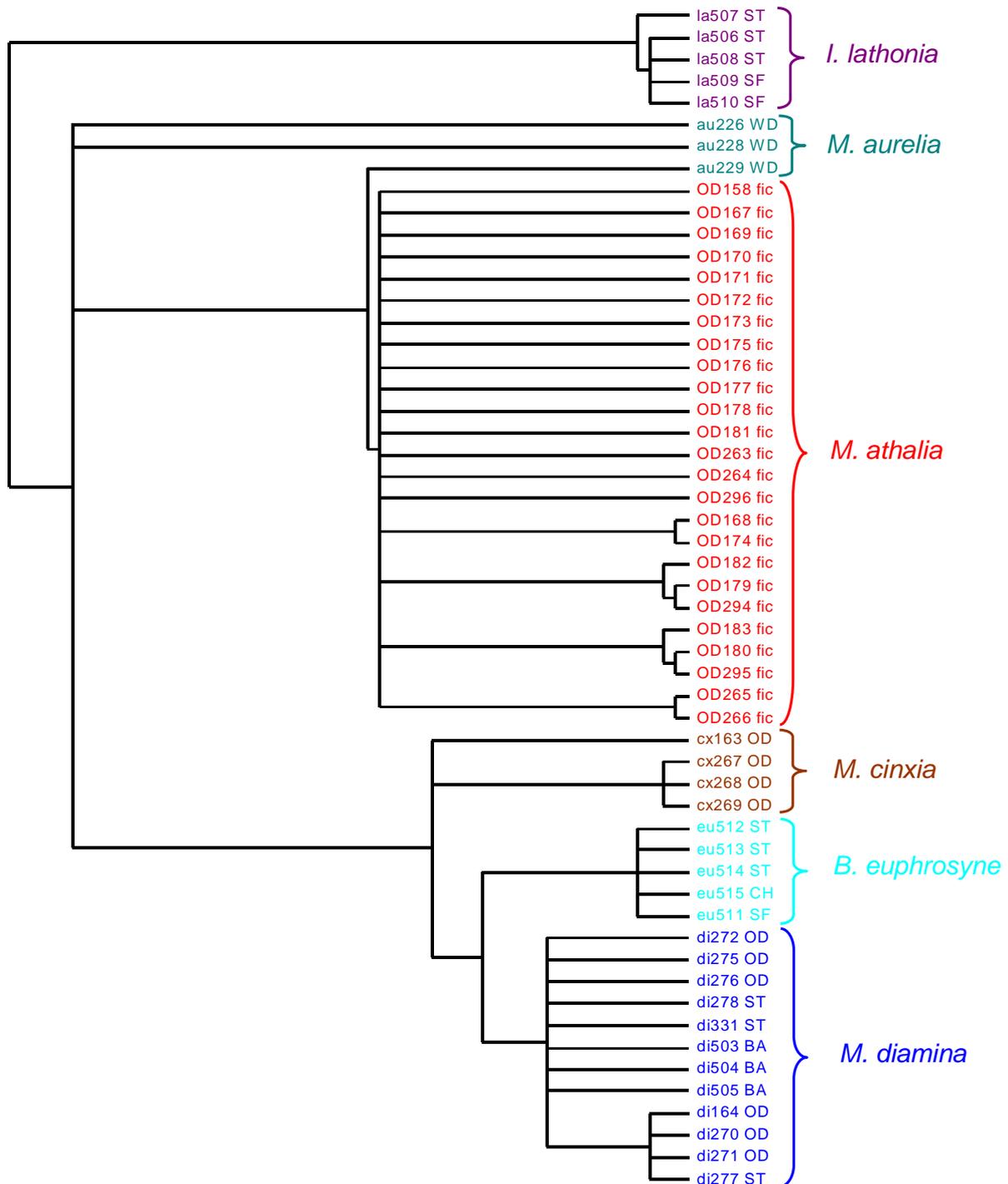


Abb. 3.4: Strikter Konsensusbaum der „Maximum Parsimony“-Analyse der Datenmatrix des Primers UBC-865.

Folgende Einstellungen wurden für die heuristische Suche vorgenommen: „set maxtree=30000“, „addseq=closest“, „branchswapping=tbr“. Die Konsensustopologie hat eine Länge von 160 Schritten. Folgende Indizes wurden errechnet: $CI = 0,2625$, $CI_{excl} = 0,2436$, $HI = 0,7375$, $HI_{excl} = 0,7564$, $RI = 0,7281$, $RC = 0,1911$. Erläuterung: CI = Konsistenzindex, CI_{excl} = Konsistenzindex ohne nichtinformativ Merkmale, HI = Homoplasieindex, HI_{excl} = Konsistenzindex ohne nichtinformativ Merkmale, RI = Konservierungsindex, RC = berichteter Konsistenzindex.

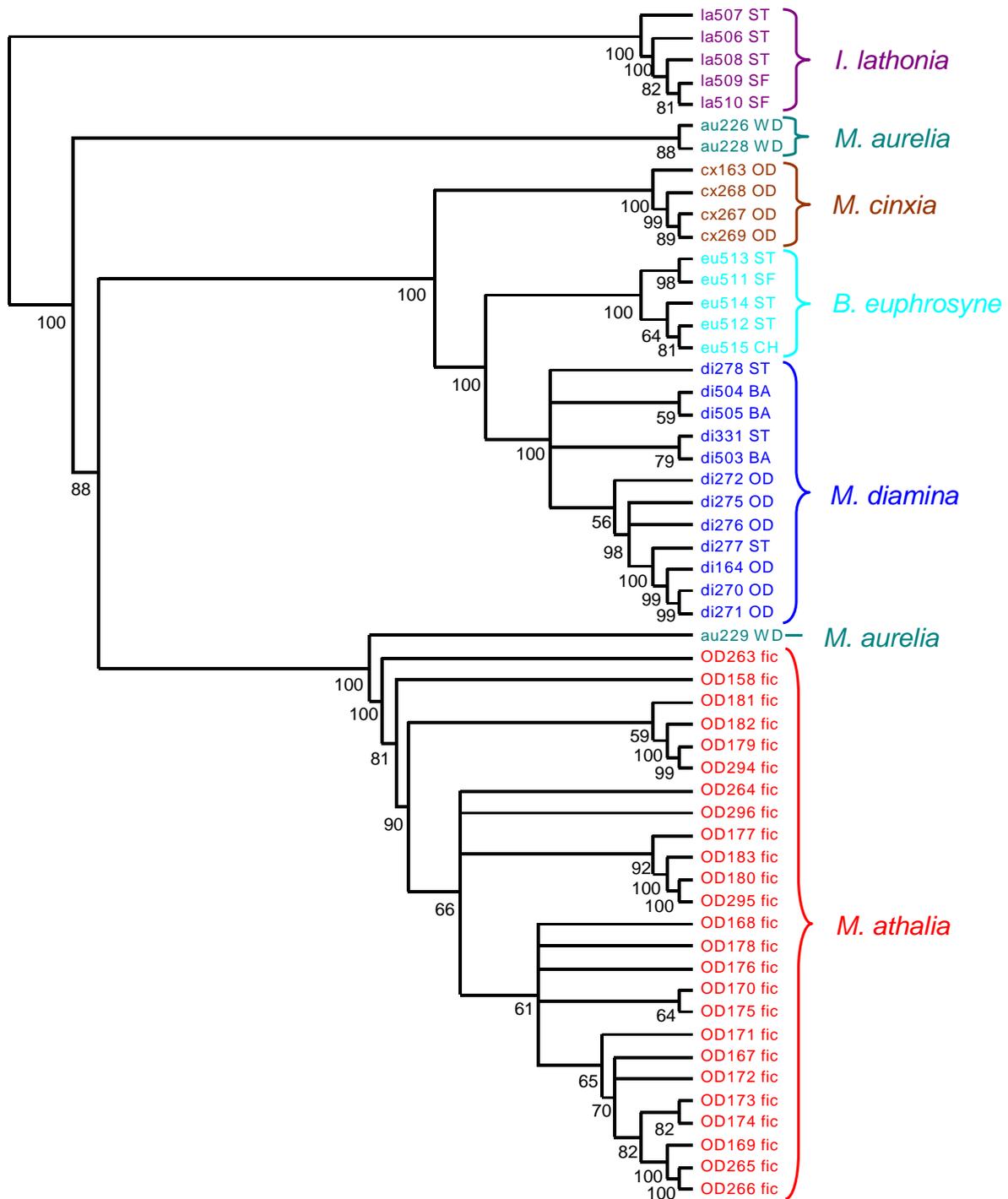


Abb. 3.5: „50 %-majority-rule“-Konsensusbaum der „Maximum Parsimony“-Analyse der Datenmatrix des Primers UBC-865.

Die Einstellungen sowie die Indizes sind mit denen des strikten Konsensusbaumes in Abb. 3.4 identisch.

3.1.1.4.4 Überprüfung des MP-Dendrogramms mit „Bootstrapping“

Um die Ergebnisse abzusichern, wurde für den Datensatz unter dem „Maximum Parsimony“-Kriterium eine „Bootstrap“-Analyse durchgeführt. Dabei entsprachen die Suchparameter denen der heuristischen Suche. Der sich hieraus ergebende Konsensusbaum (Abb. 3.6) folgt der „50 %-majority-rule“ und setzt sich somit nur aus solchen Verzweigungen zusammen, die in mindestens 50 % der berechneten Topologien gefunden wurden. Insgesamt ist die Auflösung im Gegensatz zu den vorangegangenen Diagrammen deutlich geringer. Schwestergruppenverhältnisse sind nicht mehr erkennbar. Lediglich die Monophylie der Arten *I. lathonia*, *M. cinxia* und *M. diamina* bleibt erhalten, während *M. athalia*, *M. aurinia* und *B. euphrosyne* keine Verwandtschaftsverhältnisse erkennen lassen.

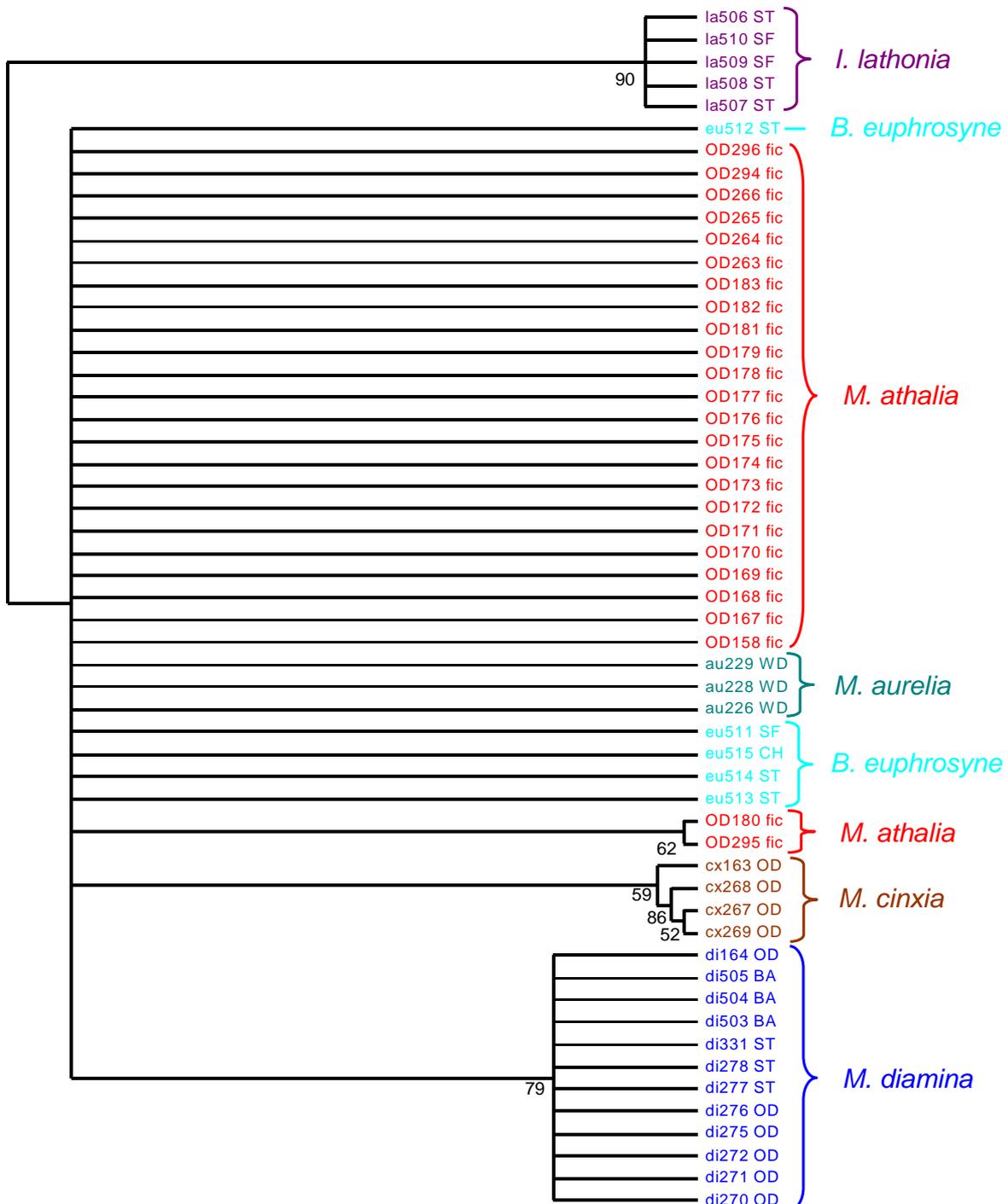


Abb. 3.6: „Maximum Parsimony bootstrap“-Analyse der durch den Primer UBC-865 erhaltenen Datenmatrix.

Folgende Parameter galten für die heuristische Suche: „stepwise addition = closest“, „branchswapping = tbr“. Es wurden 1000 Replikationen berechnet, die einzelnen „bootstrap“-Werte sind an den jeweiligen Knoten aufgeführt. Es handelt sich um einen „50%-majority-rule“-Konsensusbaum mit einer Länge von 297 Schritten. Folgende Indizes wurden errechnet: $CI = 0,1414$, $CI_{excl} = 0,1297$, $HI = 0,8586$, $HI_{excl} = 0,8703$, $RI = 0,4124$, $RC = 0,0583$. Erläuterung: CI = Konsistenzindex, CI_{excl} = Konsistenzindex ohne nichtinformativ Merkmale, HI = Homoplasieindex, HI_{excl} = Konsistenzindex ohne nichtinformativ Merkmale, RI = Konservierungsindex, RC = berichteter Konsistenzindex.

3.1.1.5 Primer UBC-880

Die Größe der von Primer 880 produzierten Fragmente schwankt zwischen 3000 und 200 bp. Fast alle *M. athalia*-Individuen (151 von 164, d.h. 92,07 %) weisen das Fragment 2300 bp auf, welches jedoch nicht artspezifisch ist, da es auch bei *M. aurelia*, *M. cinxia* und *B. euphrosyne* zu 100 %, bei *M. diamina* zu 91,7 % vorhanden ist. *I. lathonia* ist die einzige Art, bei der das Fragment 2300 bp bei keinem Tier nachgewiesen wurde. Ebenfalls relativ häufig zu finden ist das Fragment 510 bp, und zwar populationsunabhängig. *M. cinxia* zeigt ein 1790 bp langes Amplifizierungsprodukt, das sich bei keiner der anderen Proben findet und somit zur Artunterscheidung geeignet scheint. Artspezifisch ist auch das Fragment 2200 bp für *M. diamina* (83,3 % der Stichproben) (Tabelle 3.9).

Tab. 3.9: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-880

Taxon	Populationen	n	Fragmente bp	Anzahl Banden	Anzahl polymorpher Banden	% p B	spezifische Fragmente (Anteil in %)	„gene diversity“ h (Nei 1973)	Shannon's Diversitätsindex I
<i>lathonia</i>	divers	5	1500 – 590	4	4	100	-	0,3380 (0,1134)	0,5155 (0,1325)
<i>euphrosyne</i>	divers	5	3000 – 810	9	6	66,67	2300, 810, 590 (100%)	0,1777 (0,1677)	0,2855 (0,2446)
<i>cinxia</i>	Brandenburg	4	2300 – 390	6	4	66,67	2300, 1790 (je 100%) 390 (75%)	0,2297 (0,2062)	0,3476 (0,2938)
<i>diamina</i>	divers	12	2600 – 330	14	9	64,29	800, 490, 440, 390, 330 (100%)	0,1154 (0,1543)	0,1948 (0,2198)
<i>aurelia</i>	Eifel	2	2300 – 330	6	5	83,33	2300 (100%)	0,3452 (0,1691)	0,5039 (0,2469)
<i>athalia</i>	Eifel	8	2300 – 350	12	11	91,67	2300 (100%)	0,1991 (0,1101)	0,3371 (0,1568)
<i>athalia</i>	Fichtelberg (Sachsen)	29	2300 – 330	24	24	100	2300 (96,55%)	0,1343 (0,1217)	0,2406 (0,1701)
<i>athalia</i>	Brandenburg	8	2300 – 330	10	9	90	2300 (100%) 440 (88,89%)	0,2150 (0,1468)	0,3513 (0,1990)
<i>athalia</i>	Polen (Ost)	13	3000 – 330	21	20	95,24	2300 (100%) 510 (80%)	0,1584 (0,1389)	0,2744 (0,1843)
<i>athalia</i>	Finnland	4	2300 – 720	12	10	83,33	2300, 720 (100%)	0,2612 (0,1563)	0,4059 (0,2198)
<i>athalia</i>	Vorarlberg	10	2300 – 330	18	17	94,44	2300 (100%)	0,1968 (0,1337)	0,3305 (0,1776)
<i>athalia</i>	Südtirol	36	3000 – 330	36	36	100	2300 (66,67%) 560 (69,44%) 510 (80,56%)	0,1311 (0,1602)	0,2257 (0,2119)
<i>athalia</i>	Wallis	24	2900 – 330	16	15	93,75	2300 (100%) 440 (83,3%)	0,1920 (0,1634)	0,3141 (0,2203)
<i>athalia</i>	Ligurien	4	2300 - 330	12	11	91,67	2300 (100%) 1000, 510 (66,67%)	0,2458 (0,1350)	0,3952 (0,1799)
<i>athalia</i>	Südfrankreich (gesamt)	25	2300 – 330	31	30	96,77	2300 (100%) 510 (72%)	0,0927 (0,1064)	0,1790 (0,1440)
<i>athalia</i>	Peira Cava, Lucéram Südfrankreich	8	2300 - 330	17	16	94,12	2300 (100%)	0,1646 (0,0866)	0,2939 (0,1256)
<i>athalia</i>	Tende Südfrankreich	7	2300 – 330	5	4	80	2300 (100%) 510 (85,7%)	0,3115 (0,2275)	0,4525 (0,3075)
<i>athalia</i>	St.Martin Vs. Südfrankreich	10	2300 – 330	18	17	94,44	2300 (100%) 510 (90%)	0,1827 (0,1240)	0,3135 (0,1645)
<i>athalia</i>	alle Populationen zusammen	164	3000 – 200	55	55	100	2300 (92,07%)	0,0641 (0,1021)	0,1233 (0,1513)

Erläuterung s. Tab. 3.4

3.1.2 Primer mit eingeschränkten Trennmöglichkeiten

3.1.2.1 Primer UBC-810

Primer 810 zeigt ein uneinheitliches Bild. Die Fragmentgrößen schwanken zwischen 4500 und 320 bp. Nur die kleine ligurische Stichprobe wies mit Marker 610 bei *M. athalia* eine Monomorphie aus. Bei den anderen Arten konnte dies bei *I. lathonia* (700 bp), *B. euphrosyne* (530 bp) und bei *M. aurelia* (3500 bp und 1020 bp) festgestellt werden. Die *M. athalia*-Populationen wiesen ansonsten nur Anhäufungen bestimmter Fragmentgrößen auf, eine Trennung der Populationen war aufgrund der Variabilität innerhalb der Populationen nur eingeschränkt möglich. Marker 980 war in den östlichen Populationen Brandenburg zu 80 % und Polen zu 75 % vertreten (Tabelle 3.10).

Tab. 3.10: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-810

Taxon	Populationen	n	Fragmente bp	Anzahl Banden	Anzahl polymorpher Banden	% p B	spezifische Fragmente (Anteil in %)	„gene diversity“ h (Nei 1973)	Shannon's Diversitätsindex I
<i>lathonia</i>	divers	5	1380 - 540	9	8	88,89	700 (100%)	0,1985 (0,1178)	0,3353 (0,1645)
<i>euphrosyne</i>	divers	5	2300 - 530	15	14	93,33	530 (100%) 990, 800 (80%)	0,2782 (0,1419)	0,4352 (0,1837)
<i>cinxia</i>	Brandenburg	4	3000 - 400	9	9	100	-	0,3225 (0,1105)	0,4974 (0,1257)
<i>diamina</i>	divers	12	2350 - 490	14	14	100	-	0,2200 (0,1338)	0,3650 (0,1658)
<i>aurelia</i>	Eifel	3	3500 - 680	11	9	81,82	3500, 1020 (100%)	0,3308 (0,1861)	0,4829 (0,2575)
<i>athalia</i>	Fichtelberg (Sachsen)	28	2700 - 400	42	42	100	-	0,1563 (0,1251)	0,2730 (0,1731)
<i>athalia</i>	Brandenburg	5	3500 - 410	16	16	100	1175, 980, 650, 490 (80%)	0,3126 (0,1371)	0,4816 (0,1563)
<i>athalia</i>	Polen (Ost)	12	4500 - 320	36	36	100	980 (75%)	0,2326 (0,1479)	0,3771 (0,1870)
<i>athalia</i>	Finnland	4	1600 - 410	16	16	100	1300, 490 (75%)	0,2883 (0,1031)	0,4576 (0,1163)
<i>athalia</i>	Vorarlberg	17	3500 - 340	35	35	100	-	0,1701 (0,1036)	0,2992 (0,1429)
<i>athalia</i>	Südtirol	8	3000 - 680	7	7	100	780 (87,5%)	0,2686 (0,1553)	0,4244 (0,1912)
<i>athalia</i>	Wallis	23	3500 - 370	31	31	100	720 (86,95%)	0,1853 (0,1351)	0,3147 (0,1771)
<i>athalia</i>	Ligurien	5	3400 - 490	17	16	94,12	610 (100%)	0,2006 (0,1142)	0,3405 (0,1506)
<i>athalia</i>	Südfrankreich (gesamt)	23	4000 - 370	44	44	100	-	0,1483 (0,1155)	0,2638 (0,1604)
<i>athalia</i>	Peira Cava, Lucéram Südfrankreich	8	3500 - 370	31	31	100	-	0,2182 (0,0995)	0,3681 (0,1255)
<i>athalia</i>	Tende Südfrankreich	7	3500 - 370	13	13	100	1050 (85,7%)	0,3117 (0,1401)	0,4792 (0,1684)
<i>athalia</i>	St.Martin Vs. Südfrankreich	8	4000 - 370	28	28	100	-	0,2545 (0,1155)	0,4120 (0,1454)
<i>athalia</i>	alle Populationen zusammen	127	4500 - 320	70	70	100	-	0,0911 (0,0915)	0,1747 (0,1421)

Erläuterung s. Tab. 3.4

3.1.2.2 Primer UBC-868

Primer UBC-868 zeigt ein variables Markerfeld. Art- oder Populationsspezifität ist nicht zu erkennen, obgleich es Fragmente gibt, die je nach Taxon oder Population mehr oder weniger häufig amplifiziert werden. Interessant ist der Marker 1580 bp, der außerhalb von *M. athalia* nur einmal festgestellt werden konnte, andererseits nicht in allen Populationen bei jedem Tier nachweisbar ist (Tabelle 3.11).

Tab. 3.11: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-868

Taxon	Populationen	n	Fragmente bp	Anzahl Banden	Anzahl polymorpher Banden	% p B	spezifische Fragmente (Anteil in %)	„gene diversity“ h (Nei 1973)	Shannon's Diversitätsindex I
<i>lathonia</i>	divers	5	3700 – 750	10	10	100	-	0,2530 (0,0828)	0,4158 (0,1015)
<i>euphrosyne</i>	divers	5	2300 – 400	7	7	100	1500 (80%)	0,2948 (0,1394)	0,4611 (0,1616)
<i>cinxia</i>	Brandenburg	4	3200 – 550	12	12	100	3200 (75%)	0,2999 (0,1027)	0,4715 (0,1170)
<i>diamina</i>	divers	12	2400 – 450	13	13	100	600 (91,67%)	0,2032 (0,1562)	0,3360 (0,2004)
<i>aurelia</i>	Eifel	2	3500 – 600	10	6	60	3500, 2400, 1950, 1100 (100%)	0,2485 (0,2139)	0,3628 (0,3123)
<i>athalia</i>	Eifel	8	2400 – 530	12	12	100	-	0,2071 (0,1135)	0,3512 (0,1453)
<i>athalia</i>	Fichtelberg (Sachsen)	29	3200 – 420	28	28	100	-	0,1513 (0,1260)	0,2655 (0,1744)
<i>athalia</i>	Brandenburg	8	3100 – 490	20	20	100	-	0,1794 (0,846)	0,3177 (0,1098)
<i>athalia</i>	Polen (Ost)	13	3000 – 530	17	17	100	-	0,1736 (0,0941)	0,3081 (0,1220)
<i>athalia</i>	Finnland	4	2700 – 490	7	6	85,71	880 (100%)	0,2770 (0,1524)	0,4280 (0,2162)
<i>athalia</i>	Vorarlberg	9	2800 – 490	19	19	100	1580 (66,67%)	0,2090 (0,1110)	0,3539 (0,1411)
<i>athalia</i>	Südtirol	34	3700 – 350	32	32	100	1580 (67,64%)	0,0792 (0,0944)	0,1578 (0,1321)
<i>athalia</i>	Wallis	24	3500 – 620	21	20	95,24	1580 (100%)	0,1570 (0,1237)	0,2747 (0,1708)
<i>athalia</i>	Ligurien	4	2600 – 910	4	4	80	1580 (100%)	0,2757 (0,1932)	0,4171 (0,2676)
<i>athalia</i>	Südfrankreich (gesamt)	22	3300 – 600	23	23	100	2300, 1580 (73,91%)	0,1181 (0,1290)	0,2165 (0,1679)
<i>athalia</i>	Peira Cava, Lucéram Südfrankreich	8	3200 – 600	18	17	94,44	2300 (100%)	0,1630 (0,1020)	0,2898 (0,1385)
<i>athalia</i>	Tende Südfrankreich	6	2300 – 720	4	4	100	-	0,2936 (0,1044)	0,4635 (0,1270)
<i>athalia</i>	St.Martin Vs. Südfrankreich	8	3300 – 700	12	12	100	1580 (87,5%)	0,2203 (0,1507)	0,3625 (0,1854)
<i>athalia</i>	alle Populationen zusammen	155	3700 – 350	52	52	100	-	0,0673 (0,7898)	0,1371 (0,1212)

Erläuterung s. Tab. 3.4

3.1.2.3 Primer UBC-878

Bei Primer UBC-878 findet man je nach Taxon unterschiedliche Verteilungsschwerpunkte bestimmter Marker. Als art- oder populationsspezifisch erwies sich letztlich keiner. Bei *I. lathonia* waren 3 Marker gleichzeitig bei allen Tieren nachweisbar. Daher müssen zur eindeutigen Identifizierung diese 3 Marker gemeinsam zu finden sein. *M. athalia*-Populationen unterscheiden sich durch unterschiedliche Häufungen diverser Banden, klare Trennungen können nicht festgestellt werden (Tabelle 3.12).

Tab. 3.12: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-878

Taxon	Populationen	n	Fragmente bp	Anzahl Banden	Anzahl polymorpher Banden	% p B	spezifische Fragmente (Anteil in %)	„gene diversity“ h (Nei 1973)	Shannon's Diversitätsindex I
<i>lathonia</i>	divers	5	3000 - 640	20	17	85	1800, 1100, 900 (je 100%)	0,2500 (0,1478)	0,3936 (0,2074)
<i>euphrosyne</i>	divers	5	3500 - 750	15	14	93,33	1200 (100%)	0,2054 (0,976)	0,3491 (0,1344)
<i>cinxia</i>	Brandenburg	4	2500 - 550	20	20	100	2000 (75%)	0,3317 (0,1052)	0,5081 (0,1200)
<i>diamina</i>	divers	12	3600 - 1150	15	15	100	2100 (75%), 3600, 2000 (66,67%)	0,2791 (0,1439)	0,4388 (0,1752)
<i>aurelia</i>	Eifel	2	3400 - 750	9	8	88,89	750 (100%)	0,3682 (0,1381)	0,5375 (0,2016)
<i>athalia</i>	Fichtelberg (Sachsen)	46	4000 - 520	42	42	100	800 (63,04%)	0,1205 (0,1115)	0,2227 (0,1525)
<i>athalia</i>	Brandenburg	5	4000 - 640	14	14	100	2100 (60%)	0,2315 (0,0887)	0,3881 (0,1051)
<i>athalia</i>	Polen (Ost)	15	4500 - 520	31	31	100	4000, 2400 (66,67%), 800 (80%)	0,2103 (0,1488)	0,3462 (0,1920)
<i>athalia</i>	Finnland	4	3900 - 640	8	8	100	2000 (75%)	0,3111 (0,1122)	0,4840 (0,1273)
<i>athalia</i>	Vorarlberg	21	4000 - 690	32	32	100	-	0,1335 (0,0950)	0,2459 (0,1371)
<i>athalia</i>	Südtirol	10	4000 - 800	22	22	100	1700 (70%)	0,2168 (0,1178)	0,3631 (0,1487)
<i>athalia</i>	Wallis	25	4700 - 810	23	23	100	1300 (68%)	0,2015 (0,1296)	0,3381 (0,1723)
<i>athalia</i>	Ligurien	4	1850 - 1000	8	8	100	-	0,2776 (0,0843)	0,4466 (0,0976)
<i>athalia</i>	Südfrankreich (gesamt)	23	4500 - 570	38	38	100	-	0,1370 (0,0914)	0,2526 (0,1297)
<i>athalia</i>	Peira Cava, Lucéram Südfrankreich	9	3500 - 620	23	23	100	2400 (66,67%)	0,2109 (0,1138)	0,3559 (0,1445)
<i>athalia</i>	Tende Südfrankreich	4	1700 - 620	7	7	100	1500 (75%)	0,3224 (0,1162)	0,4969 (0,1318)
<i>athalia</i>	St.Martin Vs. Südfrankreich	10	4500 - 570	30	30	100	2050 (66,67%)	0,2052 (0,1043)	0,3495 (0,1346)
<i>athalia</i>	alle Populationen zusammen	152	4700 - 520	60	60	100	-	0,0857 (0,0780)	0,1687 (0,1266)

Erläuterung s. Tab. 3.4

3.1.2.4 Primer UBC-884

Primer UBC-884 zeigt nur ein schwaches Differenzierungsvermögen: *I. lathonia* ist die einzige Art, die sich dank zweier Marker (1650 bp und 780 bp) im Verbund von den anderen Taxa differenzieren lässt. Daneben ist noch auffallend, dass bei zwei Drittel der polnischen *M. athalia*-Population mit dem Marker 980 bp sowie in etwa in der gleichen Größenordnung bei der Walliser Population mit dem Marker 720 bp jeweils Fragmente amplifiziert werden, die in diesen Populationen eine vergleichsweise hohe Verbreitung gefunden haben (Tabelle 3.13).

Tab. 3.13: Ergebnisse der ISSR-Untersuchungen mit Primer UBC-884

Taxon	Populationen	n	Frag- mente bp	Anzahl Banden	Anzahl poly- morpher Banden	% p B	spezifische Fragmente (Anteil in %)	„gene diversity“ h (Nei 1973)	Shannon's Diversitäts- index I
<i>lathonia</i>	divers	5	1900 – 740	13	11	84,62	1650, 780 (je 100%)	0,2023 (0,1358)	0,3346 (0,1899)
<i>euphrosyne</i>	divers	5	2900 – 360	21	21	100	-	0,2841 (0,0843)	0,4541 (0,0976)
<i>cinxia</i>	Brandenburg	4	1650 – 1200	6	6	100	1300 (75%)	0,3071 (0,1193)	0,4789 (0,1346)
<i>diamina</i>	divers	12	2800 – 650	19	19	100	-	0,1556 (0,0938)	0,2814 (0,1269)
<i>aurelia</i>	Eifel	3	2200 – 450	7	7	100	-	0,4073 (0,1007)	0,5935 (0,1093)
<i>athalia</i>	Fichtelberg (Sachsen)	43	3100 – 230	37	37	100	-	0,0723 (0,0766)	0,1475 (0,1181)
<i>athalia</i>	Brandenburg	4	2200 – 620	7	7	100	-	0,3224 (0,1162)	0,4969 (0,1318)
<i>athalia</i>	Polen (Ost)	14	1900 – 520	8	8	100	980 (64,23%)	0,2324 (0,1350)	0,3817 (0,1682)
<i>athalia</i>	Finnland	5	2700 – 600	11	11	100	-	0,2034 (0,0483)	0,3550 (0,0592)
<i>athalia</i>	Vorarlberg	20	2000 – 620	16	16	100	-	0,1556 (0,1451)	0,2674 (0,1982)
<i>athalia</i>	Südtirol	10	3100 – 700	18	18	100	-	0,1795 (0,0923)	0,3161 (0,1226)
<i>athalia</i>	Wallis	25	2300 – 620	15	15	100	720 (72%)	0,1357 (0,1140)	0,2481 (0,1496)
<i>athalia</i>	Ligurien	5	2300 – 650	13	12	92,31	1200 (100%)	0,2360 (0,1062)	0,3868 (0,1513)
<i>athalia</i>	Südfrankreich (gesamt)	26	2300 – 620	19	19	100	-	0,1124 (0,0883)	0,2146 (0,1284)
<i>athalia</i>	Peira Cava, Lucéram Südfrankreich	8	2000 – 620	12	12	100	-	0,1876 (0,1040)	0,3252 (0,1394)
<i>athalia</i>	Tende Südfrankreich	5	1100 – 620	5	5	100	-	0,3372 (0,1459)	0,5106 (0,1685)
<i>athalia</i>	St.Martin Vs. Südfrankreich	9	2300 – 720	11	11	100	-	0,1940 (0,1062)	0,3341 (0,1398)
<i>athalia</i>	alle Populationen zusammen	152	3100 – 230	53	53	100	-	0,0488 (0,0609)	0,1045 (0,1031)

Erläuterung s. Tab. 3.4

3.2 Gesamtanalyse anhand der Daten von mehreren Primern

3.2.1 Interspezifische ISSR-Untersuchungen bei fünf Nymphaliden-Arten

Um Vergleiche zwischen der intraspezifischen Differenzierung am Beispiel von *Melitaea athalia* und den Distanzen zwischen näher verwandten Arten ziehen zu können, wurden weitere Nymphaliden-Arten miteinbezogen. Im einzelnen sind dies die zu den Perlmutterfaltern zählenden Arten *Issoria lathonia*, *Boloria euphrosyne* sowie die wie *M. athalia* zu den Scheckenfaltern gehörenden *Melitaea diamina* und *Melitaea cinxia*. Weitere Daten liegen von einzelnen Primern auch zu den Arten *Melitaea aurelia* und *Melitaea didyma* vor. Sie werden hier aber nicht weiter berücksichtigt.

Tabelle 3.14 zeigt die Auswertung aller von den 8 ausgewählten ISSR-Primern gewonnenen Daten für die 5 untersuchten Nymphaliden-Taxa. Die Polymorphismuswerte sind durchgängig hoch und liegen bis auf *I. lathonia* über 90 Prozent. Während *B. euphrosyne*, *M. diamina* und *M. cinxia* trotz unterschiedlicher Stichprobenzahl ($n = 4 - 12$) etwa auf gleicher Höhe liegen, erreicht *M. athalia* fast 100 Prozent. Gleichzeitig sind die Diversitätsindizes nach Nei (1973) und Shannon für *M. athalia* die niedrigsten in der Vergleichsgruppe. Somit liegt die durchschnittliche Gendiversität scheinbar unter denen der anderen Arten, was vermutlich mit der hohen Stichprobenzahl zu begünden ist. Vergleicht man nämlich die kleineren Populationsstichproben von *M. athalia* mit der Gesamtstichprobe der Art, werden bei den kleineren Stichproben trotz uneinheitlicher Werte tendenziell höhere Diversitätsindizes gefunden (s. Tab. 3.17). Insofern ist die *M. athalia*-Gesamtstichprobe nur eingeschränkt mit den verhältnismäßig kleinen Stichproben der anderen Arten vergleichbar.

Bei einem hohen Polymorphismus erreicht die *M. cinxia*-Stichprobe die höchsten Indexwerte, was bedeutet, dass hier die im Vergleich zu den anderen Arten größte genetische Diversität erreicht wird. Dies ist nicht überraschend: Zwar stammt die Stichprobe vermeintlich nur aus einer Population, aber *M. cinxia* ist ein Modellbeispiel für die Ausbildung von Metapopulationen (Hanski et al. 1994). Somit ist bei der Besiedlung von Standorten nicht unbedingt von einem einheitlichen Genpool auszugehen. Ob sich die gefundenen Werte bei Einbeziehung weiterer Populationen, die einen größeren Abstand voneinander aufweisen, den anderen Arten anpassen, wäre in Zukunft zu prüfen.

Tab. 3.14: Auswertung der Loci, die von 8 ISSR-Primern für 5 Nymphalidentaxa gewonnen werden konnten.

Taxon	Populationen	Anzahl n	Anzahl Banden	Anzahl polymorpher Banden	pB in %	„gene diversity“ nach Nei (1973), <i>h</i>	Shannon's Diversitätsindex <i>I</i>
<i>lathonia</i>	alle	5	98	80	81,6	0,2292 (0,1492)	0,3643 (0,2106)
<i>euphrosyne</i>	alle	5	129	117	90,7	0,2463 (0,1362)	0,3943 (0,1809)
<i>diamina</i>	alle	12	144	134	93,1	0,2117 (0,1520)	0,3450 (0,2003)
<i>cinxia</i>	alle	4	100	92	92	0,3074 (0,1400)	0,4693 (0,1840)
<i>athalia</i>	alle	101	410	409	99,8	0,1132 (0,1115)	0,2073 (0,1623)

Die Grafik in Abbildung 3.7 lässt gut erkennen, dass die Diversitätsindizes nach Nei (1973) und Shannon in allen Fällen korreliert sind, wohingegen sich das bei den Polymorphismusanteilen in Bezug auf die Indizes nicht sagen lässt.

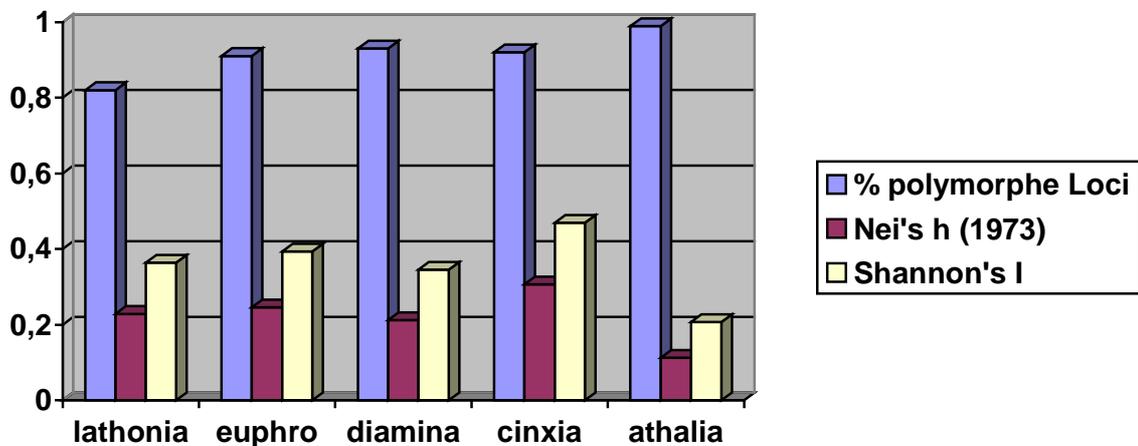


Abb. 3.7: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Analyse der Loci der 5 Nymphaliden-Arten, die bei Anwendung von 8 ISSR-Primern erhalten wurden.

Die Abkürzung „euphro“ steht für das Taxon *B. euphrosyne*.

3.2.1.1 UPGMA-Clusteranalyse auf der Basis verschiedener Distanzmaße

Insgesamt liegen für 126 Individuen komplette Datensätze vor. Die ISSR-Daten wurden in eine I/O-Matrix überführt und statistisch ausgewertet. Als Distanzmaße wurden der Dice-, der Jaccard sowie der Raup-Crick-Index verwendet und jeweils eine Clusteranalyse durchgeführt. Die

Berechnung der Dendrogramme in Abb. 3.8, 3.9 und 3.10 wurde mit der UPGMA-Methode durchgeführt. Bei der Darstellung wurde aus Platzgründen neben den vier anderen Arten nur die größte *M. athalia*-Stichprobe (Fichtelberg, Sachsen) integriert. Die Positionen der *M. athalia*-Populationen untereinander werden an anderer Stelle besprochen.

Es zeigt sich, dass die Dendrogramme, die auf dem Dice- und dem Jaccard-Index beruhen, zur gleichen Anordnung der Stichproben führen, wobei die terminalen Äste beim Jaccard-Index länger sind. Auch bei dem Raup-Crick-Index bleiben die Positionen der Arten zueinander unverändert, was als Beweis für die Stabilität der gewonnenen Daten gelten kann. Die intraspezifische Auflösung des Raup-Crick-Dendrogramms ist allerdings deutlich schlechter als bei den Dice- und Jaccard-Dendrogrammen. Dies ist auf das integrierte „Bootstrap-Verfahren“ zurückzuführen. Ein ähnlicher Effekt konnte beim „Bootstrapping“ im Rahmen des „Maximum-Parsimony“-Verfahrens beobachtet werden. Bei allen drei Bäumen werden die Taxa *B. euphrosyne* und *I. lathonia* als monophyletische Schwestergruppen ausgewiesen.

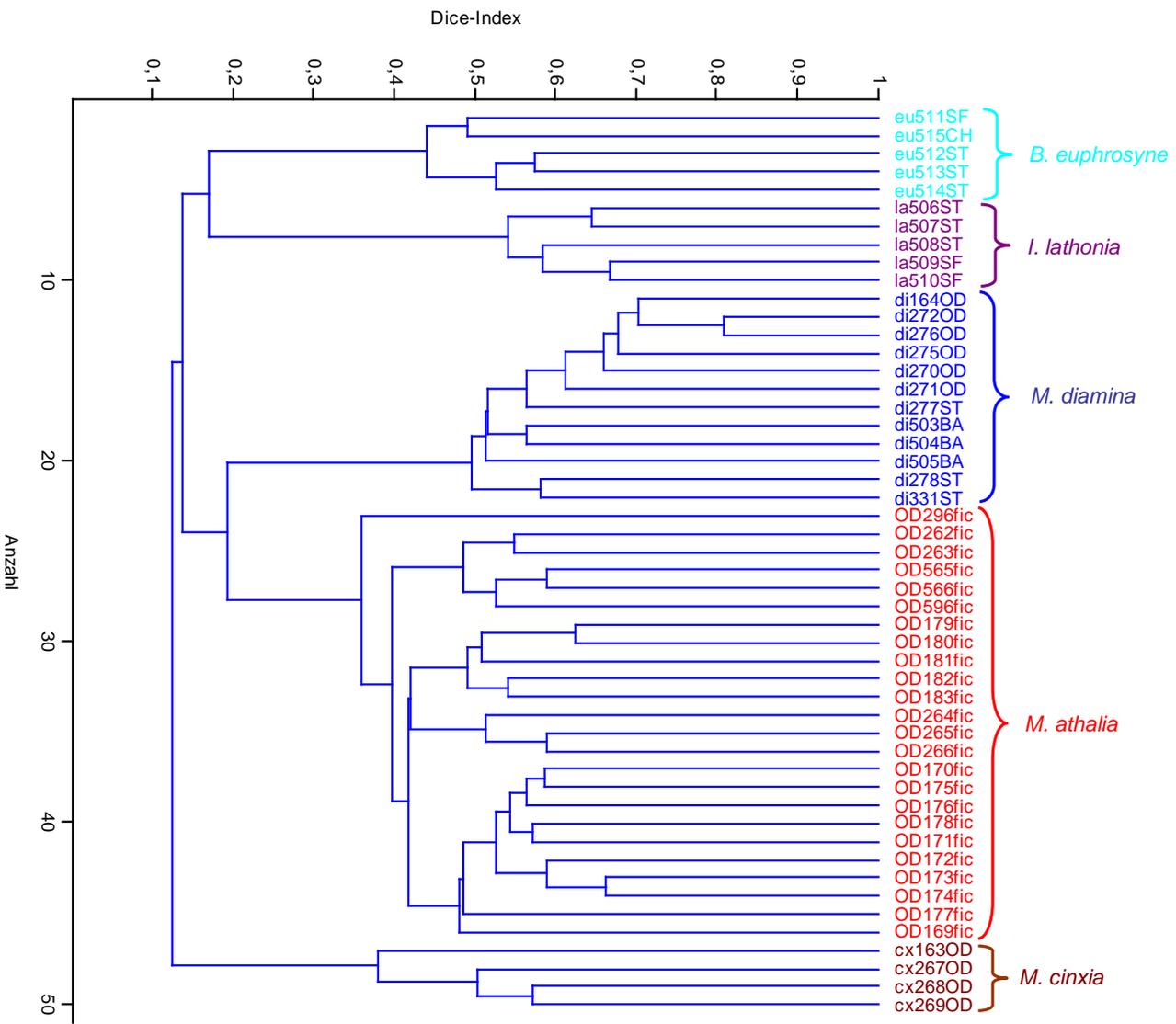


Abb. 3.8: UPGMA-Dendrogramm mit 5 Nymphaliden-Arten, basierend auf dem Dice-Index, der mit 8 Primern ermittelt wurde.

Zeichenerklärung s. Abb. 3.1.

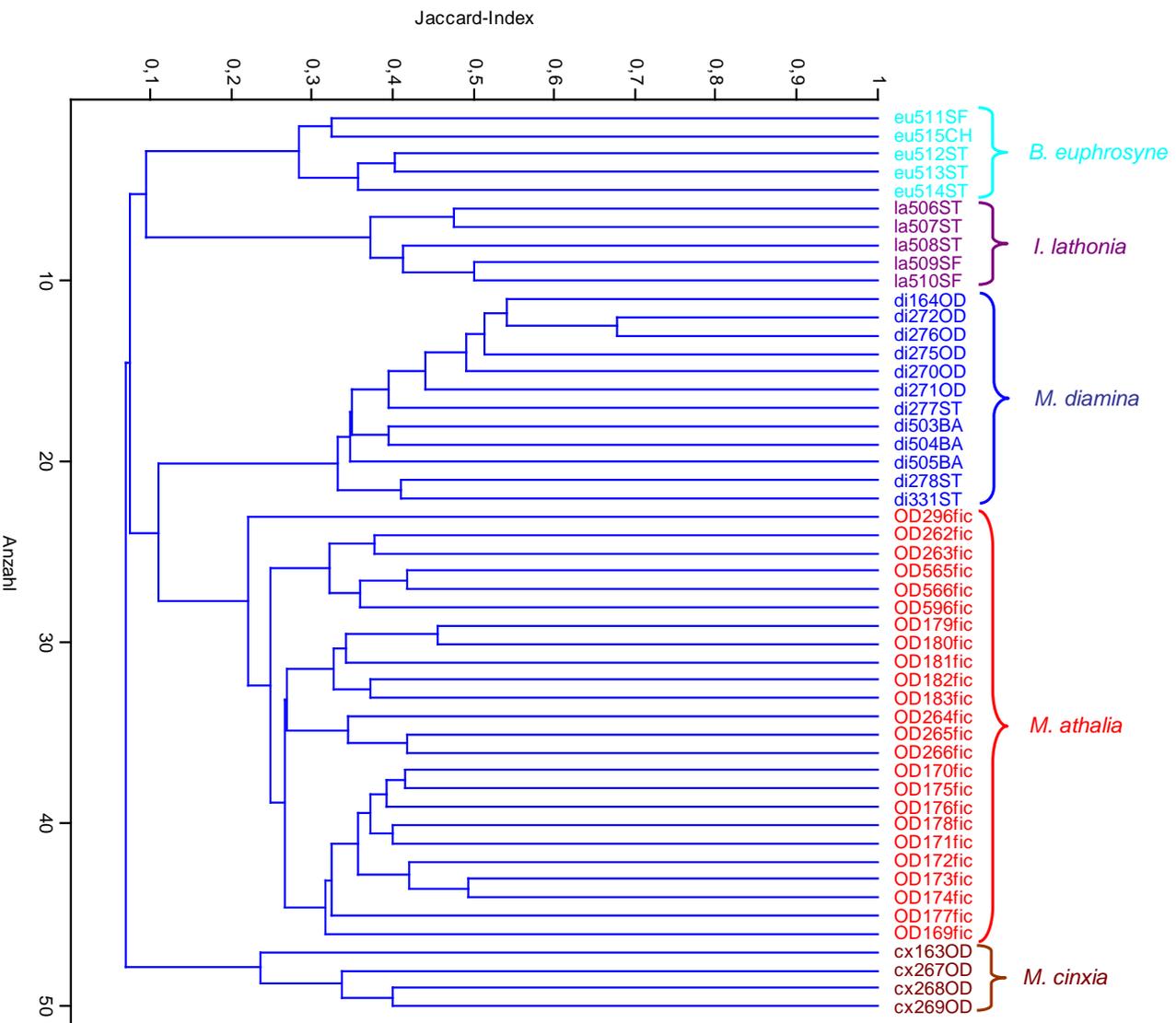


Abb. 3.9: UPGMA-Dendrogramm mit 5 Nymphaliden-Arten, basierend auf dem Jaccard-Index, der mit 8 Primern ermittelt wurde.

Zeichenerklärung s. Abb. 3.1.

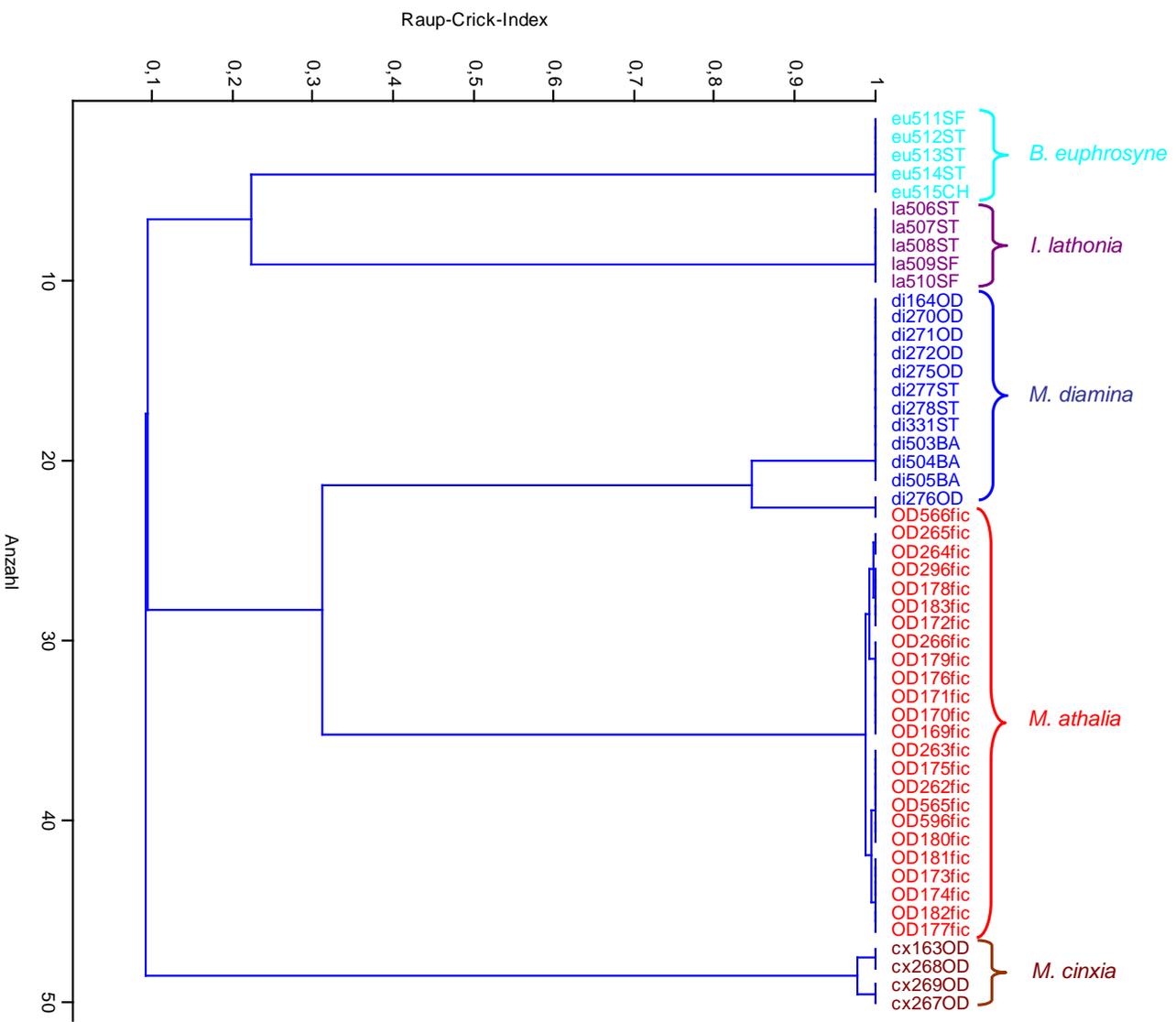


Abb. 3.10: UPGMA-Dendrogramm mit 5 Nymphaliden-Arten, basierend auf dem Raup-Crick-Index, der mit 8 Primern ermittelt wurde.

Zeichenerklärung s. Abb. 3.1.

Tab. 3.15 zeigt die Aufteilung der 126 Individuen in die fünf Nymphaliden-Arten auf der Basis der Clusteranalyse. Es wurde für jede Art der Dice-, Jaccard- und Raup-Crick-Index berechnet. Abbildung 3.11 stellt die Werte graphisch dar.

Tab. 3.15: Indizes nach Dice, Jaccard und Raup-Crick für alle komplett untersuchten Individuen der 5 Arten

Arten	Individuen	Anzahl ISSR-Marker	Dice-Index	Jaccard-Index	Raup-Crick- Index
<i>M. athalia</i>	100	410	0,3452	0,2108	0,7896
<i>M. diamina</i>	12	144	0,5472	0,3881	0,7649
<i>M. cinxia</i>	4	100	0,4505	0,2957	0,3171
<i>C. euphrosyne</i>	5	129	0,4754	0,3134	0,5203
<i>I. lathonia</i>	5	98	0,5715	0,4018	0,6253

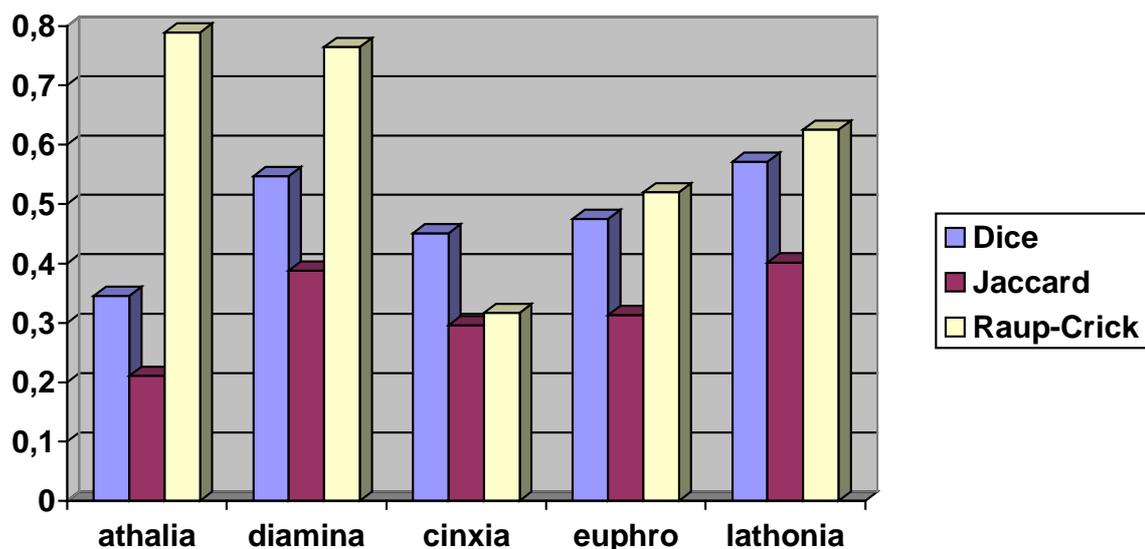


Abb. 3.11: Verhältnis der durchschnittlichen Indizes nach Dice, Jaccard und Raup-Crick bei 5 Nymphaliden-Arten.

Die Abkürzung „euphro“ steht für das Taxon *B. euphrosyne*.

Allein aus dem Durchschnitt der Index-Werte lassen sich keine Rückschlüsse auf die Verwandtschaft ziehen. Dice- und Jaccard-Index sind miteinander korreliert. Der Raup-Crick-Index fällt sehr unterschiedlich aus. *M. diamina* zeigt beim Dice- wie beim Jaccard-Index die höchsten Werte, was auf eine ungleichmäßige genetische Struktur schließen lässt. Die gesamte *M. athalia* Stichprobe weist niedrige Dice- bzw. Jaccard-Indizes auf, dagegen ist der Raup-Crick-Index sehr hoch.

3.2.1.2 Hauptkoordinatenanalyse (PCO)

Es wurde eine Hauptkoordinatenanalyse durchgeführt. Die Stichprobe setzt sich zusammen aus: *M. athalia* = 100 Proben, *M. diamina* = 12 Proben, *M. cinxia* = 4 Proben, *B. euphrosyne* = 5 Proben, *I. lathonia* = 5 Proben.

Um zu überprüfen, ob die Anwendung verschiedener Indizes zu ähnlichen Ergebnissen führt, wurden die Ähnlichkeitsindizes nach Dice, Jaccard und Raup-Crick als Grundlagen für die Berechnungen gewählt. Analog zu den bisherigen Untersuchungen wird auch hier bei der Berechnung zunächst der Dice-Index favorisiert. Abbildung 3.12 zeigt den 2-D-Blot der ersten beiden Koordinaten, Abb. 3.13 den 2-D-Blot der Koordinaten 2 und 3.

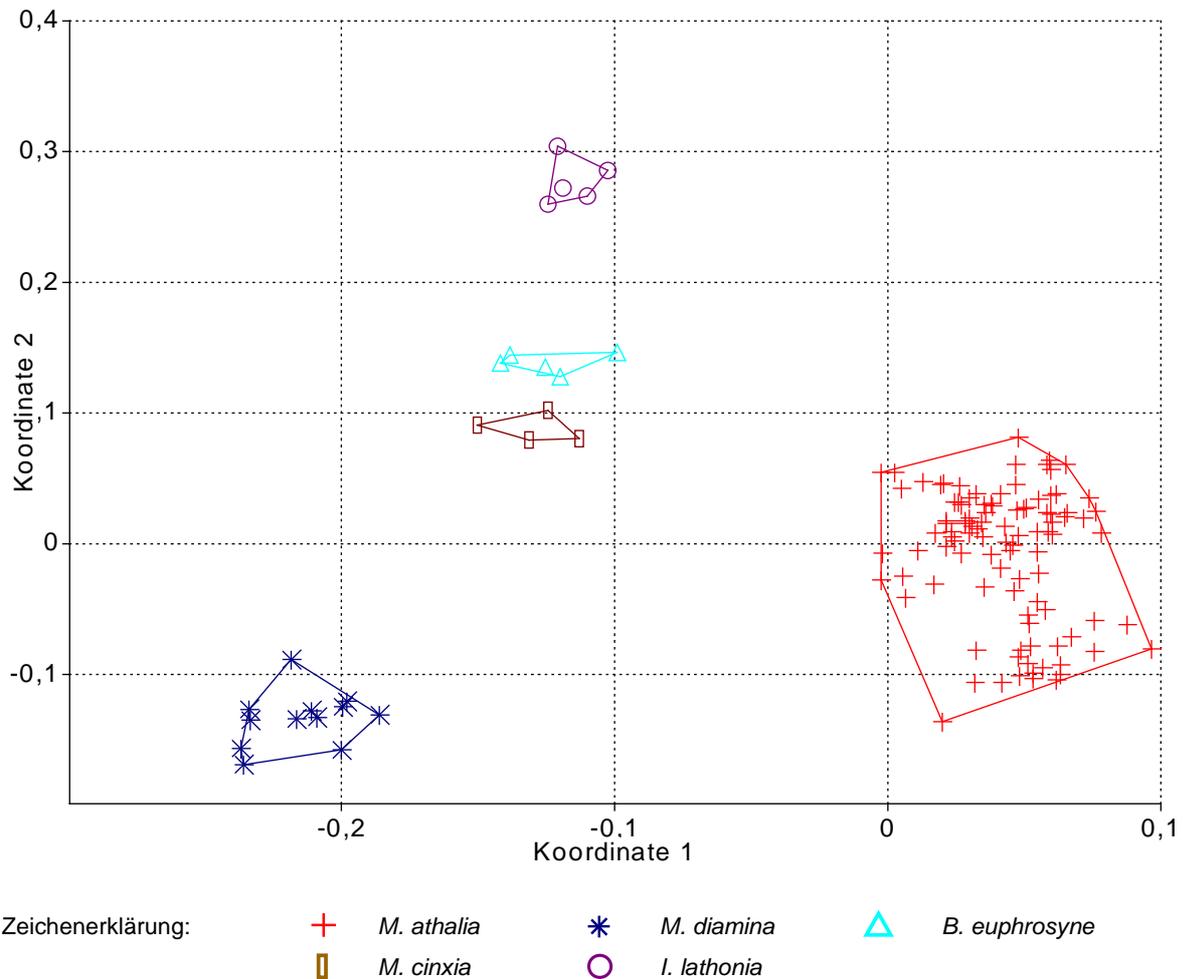


Abb. 3.12: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 1 und 2) auf Basis des Dice-Index.

Die untersuchten Individuen aus fünf Nymphaliden-Arten wurden in fünf Gruppen angeordnet.

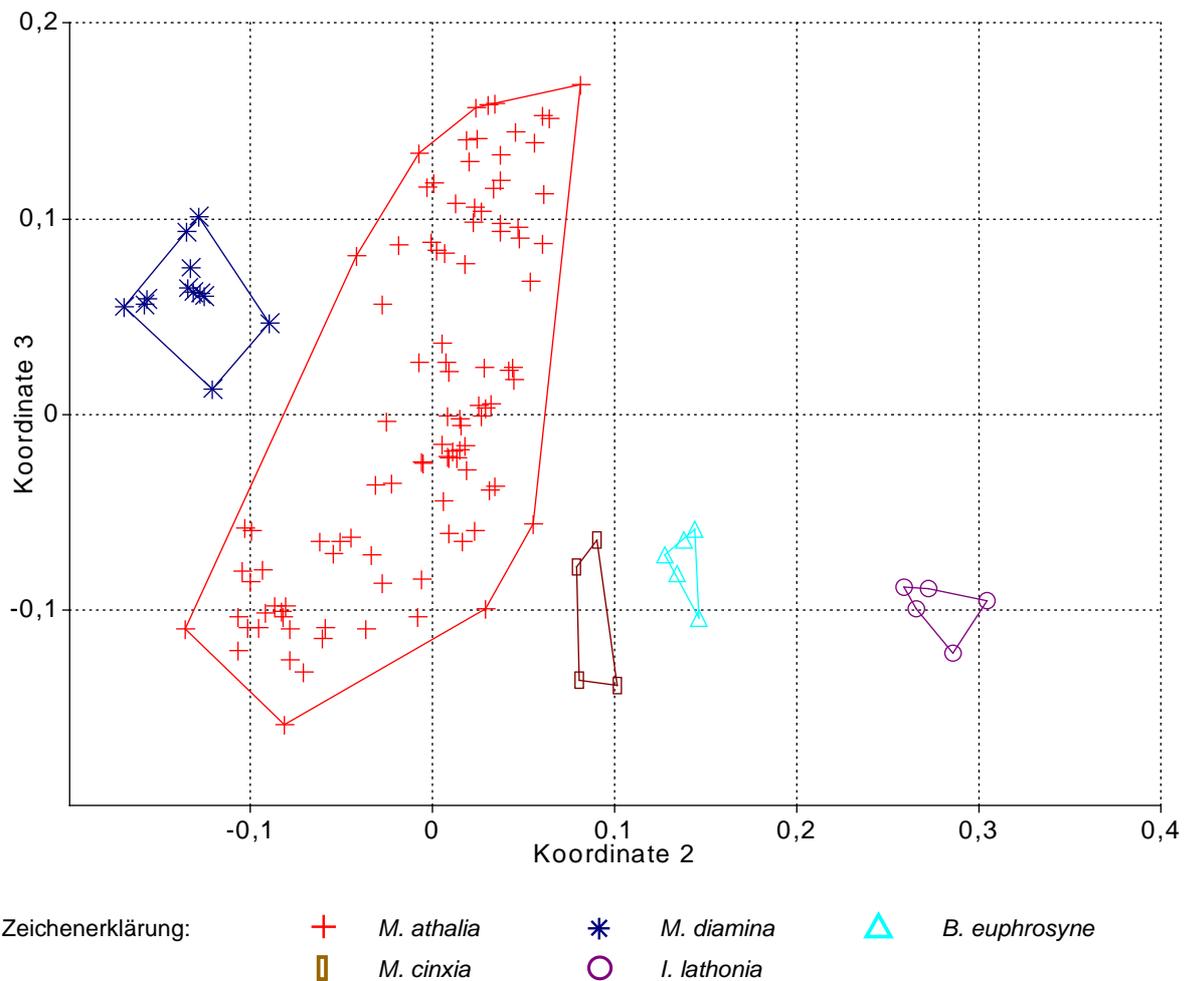
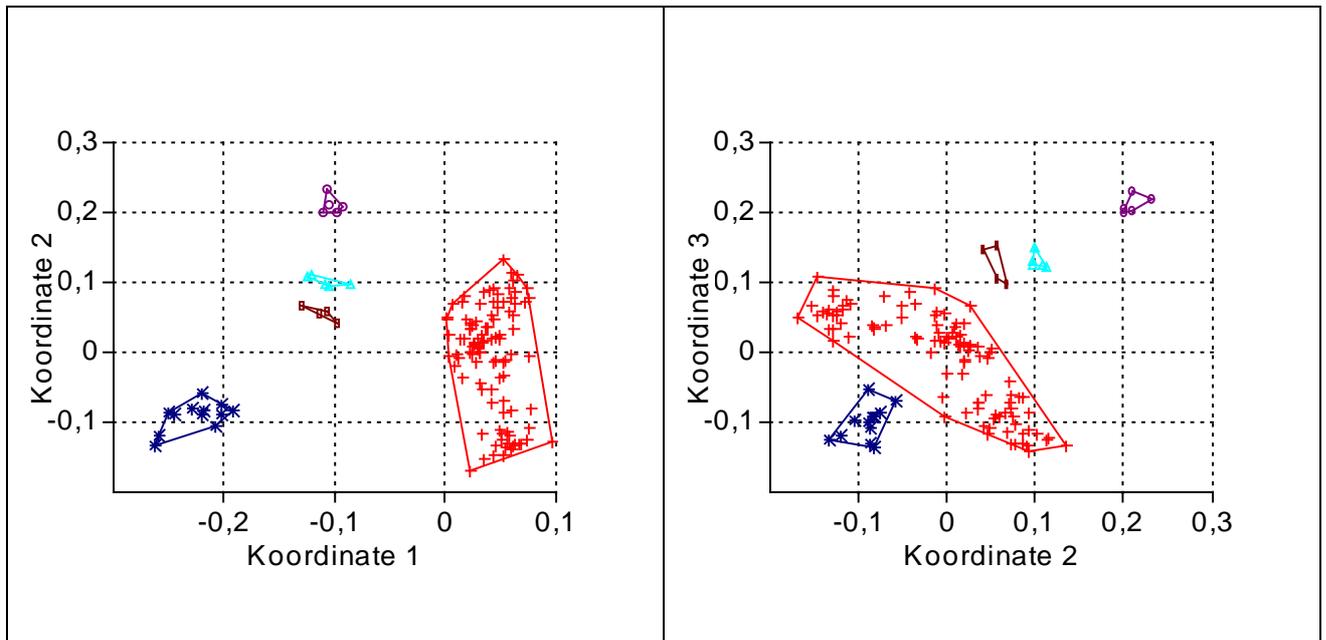


Abb. 3.13: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 2 und 3) auf Basis des Dice-Index.

Die untersuchten Individuen werden auch hier gemäß ihrer Artzugehörigkeit in 5 Gruppen angeordnet. *M. athalia* zeigt aber eine geringere Geschlossenheit als in Abb. 3.12.

Die PCO ergibt auf Basis der Eigenwerte („Eigenvalues“) 1 und 2 sowie 2 und 3 eine klare Trennung der 5 Arten in 5 Bereiche, wobei *M. cinxia* und *B. euphrosyne* relativ nahe beieinander liegen. Der Verlust an Geschlossenheit bei *M. athalia* reflektiert die Variationsbreite der Werte.

Eine weitere Hauptkoordinatenanalyse wurde mit Hilfe des Jaccard-Index durchgeführt (Abb. 3.14). Wie bereits zuvor bei der Clusteranalyse war kein gravierender Unterschied zu der Analyse festzustellen, die auf Basis des Dice-Index erstellt worden war.



Zeichenerklärung: + *M. athalia* * *M. diamina* △ *B. euphrosyne*
□ *M. cinxia* ○ *I. lathonia*

Abb. 3.14: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse auf Basis des Jaccard-Index:

Rechte Hälfte: Basis Eigenwerte 1 und 2, linke Hälfte: Basis Eigenwerte 2 und 3

Auf Basis des Raup-Crick-Index wurde eine dritte PCO erstellt. Übereinstimmend mit den Hauptkoordinatenanalysen, die auf Basis des Dice- bzw. Jaccard-Index durchgeführt wurden, kann man auch hier eine Trennung der 5 Arten klar erkennen, wobei die beiden Perlmutterfalterarten *B. euphrosyne* und *I. lathonia* relativ nahe beieinanderstehen (Abb. 3.15). Das ist auch schon in der Clusteranalyse sichtbar geworden. Betrachtet man die Eigenwerte 2 und 3 (Abb. 3.16), so ist festzustellen, dass insgesamt die Trennung der Taxa *M. cinxia*, *B. euphrosyne* und *I. lathonia* überaus deutlich wird, während die *M. athalia*-Werte eine größere Streuung erfahren.

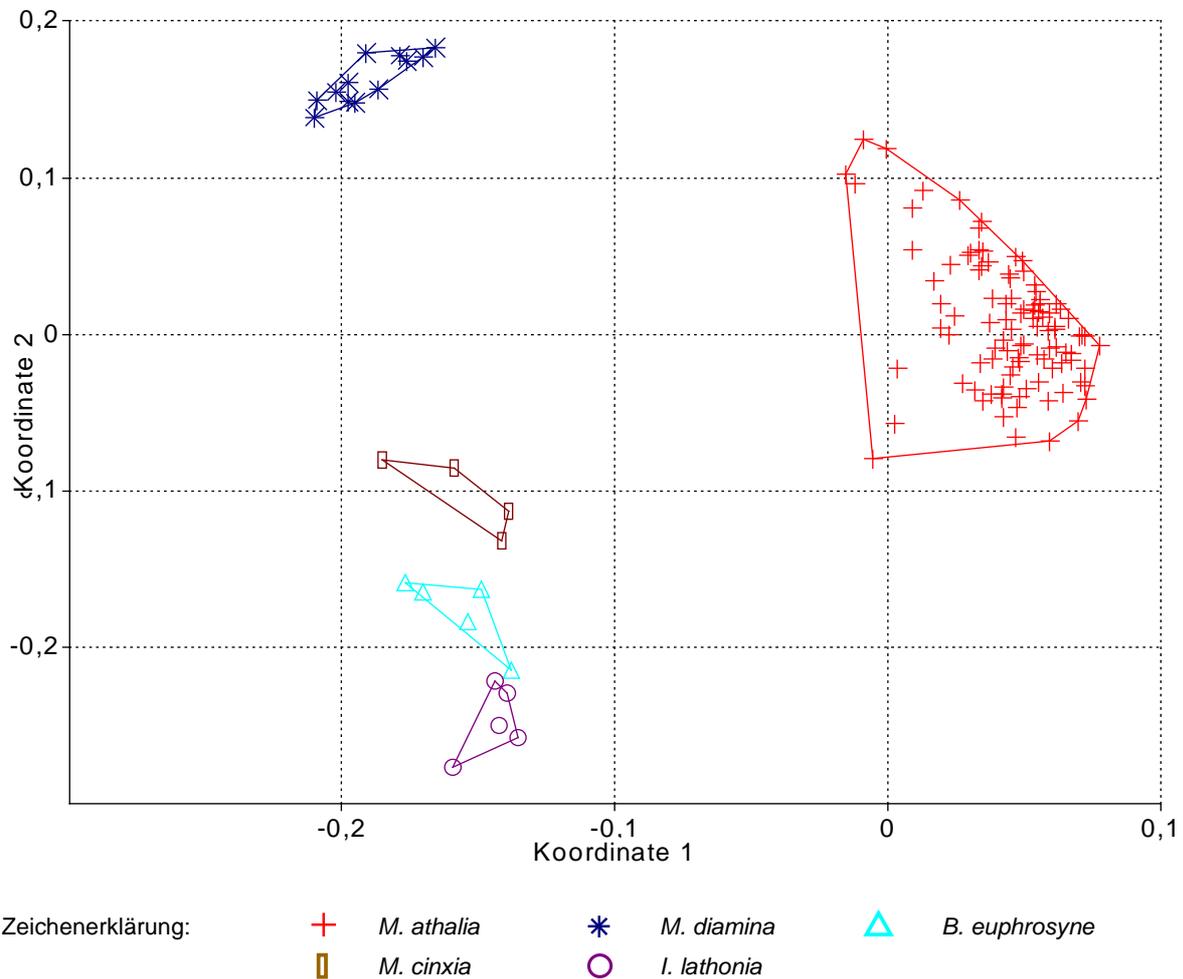
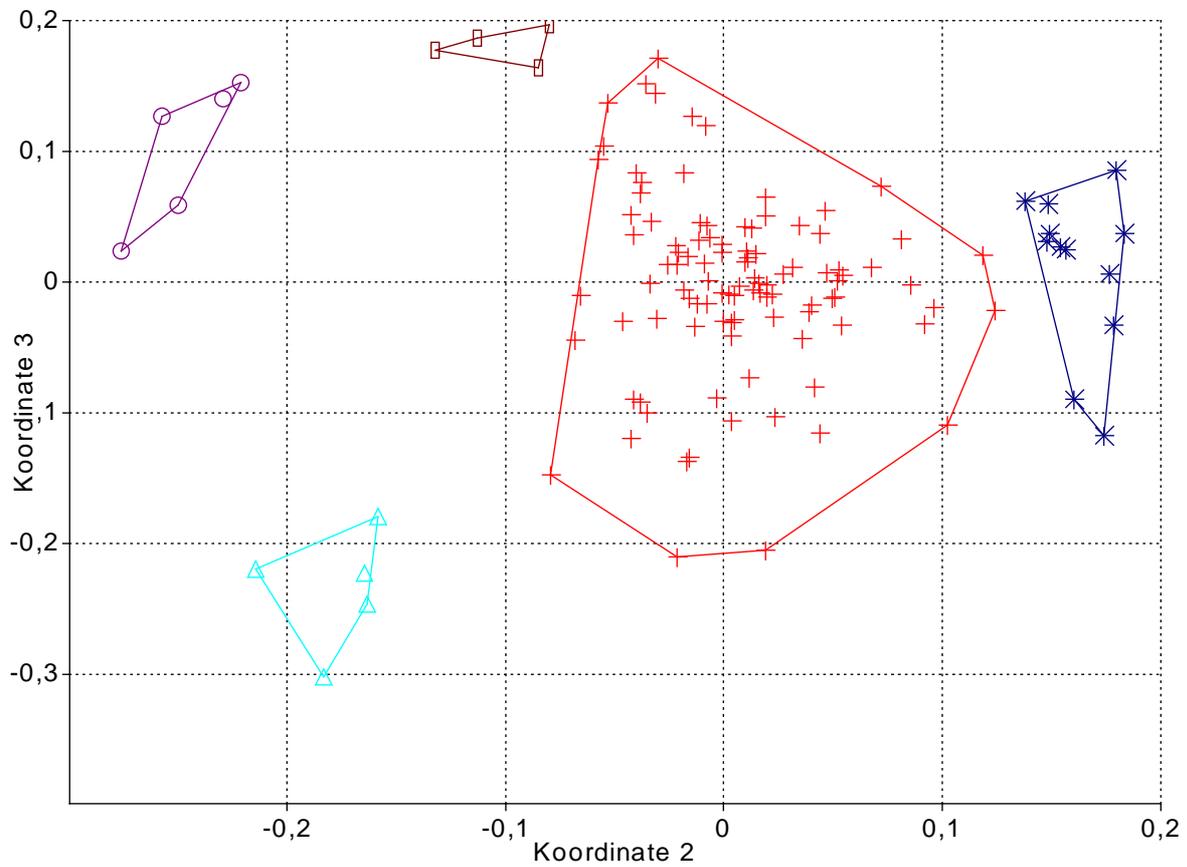


Abb. 3.15: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 1 und 2) auf Basis des Raup-Crick-Index.

Die untersuchten Individuen aus 5 Nymphaliden-Arten wurden in 5 Gruppen angeordnet.



Zeichenerklärung:

+	<i>M. athalia</i>	*	<i>M. diamina</i>	△	<i>B. euphrosyne</i>
□	<i>M. cinxia</i>	○	<i>I. lathonia</i>		

Abb. 3.16: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 2 und 3) auf Basis des Raup-Crick -Index

Die 5 Arten sind in 5 abgegrenzten Gruppen angeordnet.

Tabelle 3.16 enthält zusammenfassend für alle drei Hauptkoordinatenanalysen die errechneten Eigenwerte nebst Varianzen der fünf Nymphaliden-Arten.

Tab. 3.16: Eigenwerte 1-4, die mittels der Hauptkoordinatenanalysen auf Basis von 3 Ähnlichkeitsindizes errechnet wurden.

	Dice		Jaccard		Raup-Crick	
	Wert	% Varianz	Wert	% Varianz	Wert	% Varianz
Eigenwert 1	7,23	7,95	5,45	5,19	21,67	12,71
Eigenwert 2	4,29	4,72	3,41	3,25	9,44	5,54
Eigenwert 3	3,90	4,29	3,21	3,06	6,07	3,56
Eigenwert 4	2,87	3,16	2,38	2,27	5,77	3,39

Die Hauptkomponentenanalysen auf der Basis dreier, auf unterschiedlichen Algorithmen beruhender Ähnlichkeitsindizes führen somit zu einer artspezifischen Gruppierung der durch die ISSR-Methode gewonnenen Daten.

3.2.1.3 Stammbaumrekonstruktion durch das „Maximum-Parsimony“-Verfahren

Gemäß dem Parsimonie-Kriterium (s. 2.3.5) wurde eine heuristische Suche durchgeführt (s. 2.3.5.1). Als Außengruppe wurden die Individuen von *I. lathonia* bestimmt und die Bäume so gewurzelt. Von 363 Merkmalen waren 300 „parsimonie-informativ“. Die Suche ergab 12 beste (=kürzeste) Bäume, deren Baumlänge aus 1422 Schritten bestand. Aus dem Ergebnis wurde ein strikter Konsensusbaum errechnet (Abb. 3.17).

Der Konsensusbaum weist *M. cinxia* und *M. diamina* als Schwestergruppen aus, die ihrerseits zusammen eine Schwestergruppe zu *M. athalia* bilden. Alle Arten werden als Monophyla ausgewiesen. Dabei ist basal eine Polytomie festzustellen, die von *B. euphrosyne*, *M. athalia* und dem Taxonpaar *M. diamina* / *M. cinxia* gebildet wird. Eine weitere polytome Verzweigung findet sich innerhalb des Taxons *M. athalia*.

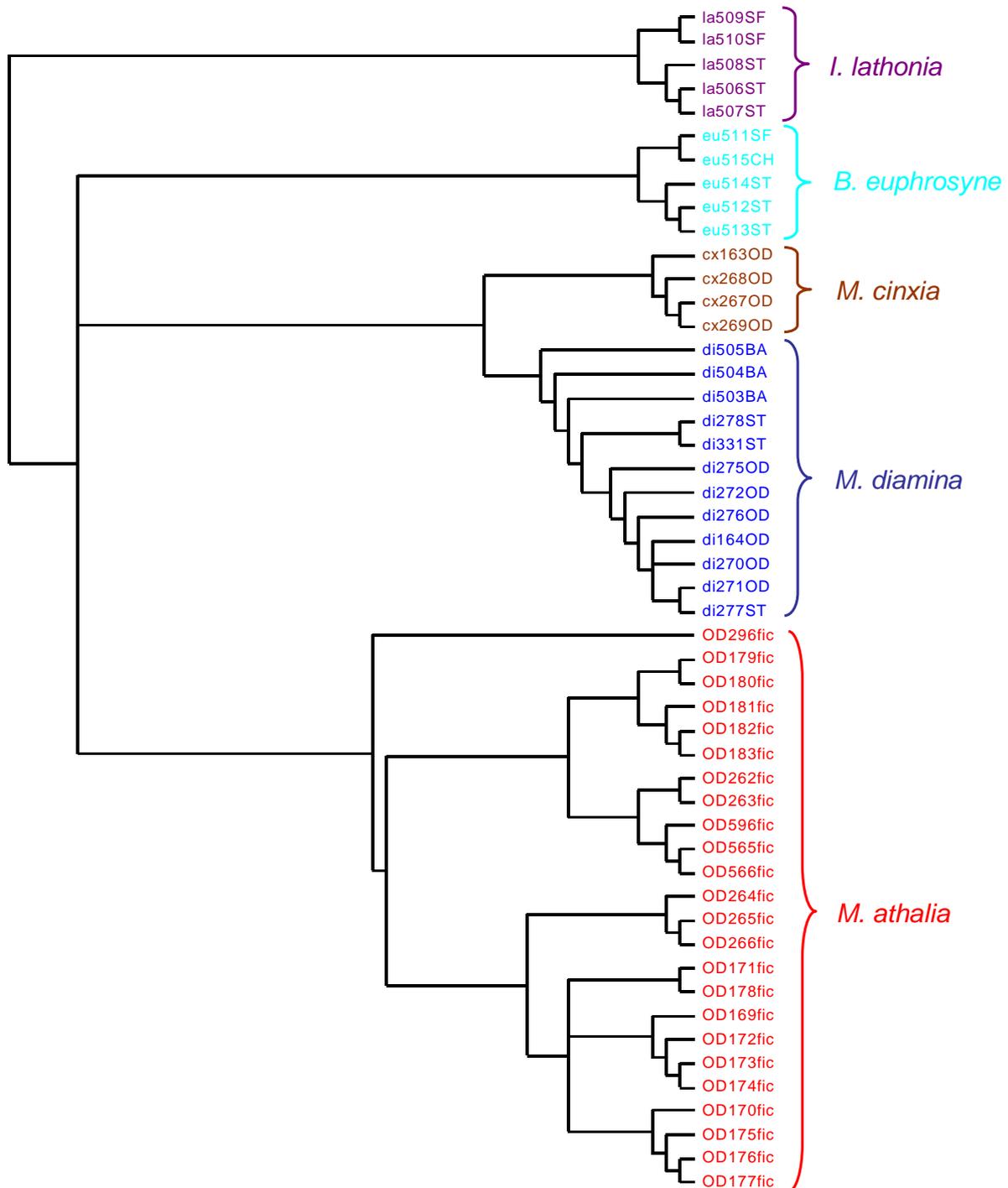


Abb. 3.17: „Strikter Konsensusbaum“ der „Maximum Parsimony“-Analyse der Datenmatrix von 5 Nymphaliden-Arten, gewonnen von 8 ISSR-Primern.

Einstellungen für die heuristische Suche: „addseq=closest“, „branchswapping=tbr“. Das Konsensuskladogramm wurde aus 12 verschiedenen Bäumen mit einer Länge von 1422 Schritten gewonnen. Folgende Indizes wurden errechnet: $CI = 0,2553$, $CI_{excl} = 0,2208$, $HI = 0,7444$, $HI_{excl} = 0,7792$, $RI = 0,4933$, $RC = 0,1259$. Erläuterung:

CI = Konsistenzindex, CI_{excl} = Konsistenzindex ohne nichtinformative Merkmale, HI = Homoplasieindex, HI_{excl} = Konsistenzindex ohne nichtinformative Merkmale, RI = Konservierungsindex, RC = berichteter Konsistenzindex.

3.2.1.4 „Bootstrapping“ als Prüfmethode für das MP-Kladogramm

Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurde unter dem Parsimonie-Kriterium eine „Bootstrap“-Analyse (s. 2.3.5.3) vorgenommen. Die verwendeten Suchparameter waren identisch mit denen der heuristischen Suche. Die Topologie wurde durch die Individuen von *I. lathonia* gewurzelt. Der erhaltene Konsensusbaum (Abb. 3.18) weist nur solche Verzweigungen auf, die in mindestens 50 % der Bäume nachgewiesen wurden („50 %-majority-rule“). Die einzelnen „bootstrap“-Werte sind an den Knoten des Kladogramms vermerkt. Im Gegensatz zur heuristischen Suche ist die Auflösung geringer. Das Schwestergruppenverhältnis zwischen *M. cinxia* und *M. diamina* wird nicht mehr unterstützt. Die Monophylie aller Arten wird dagegen bei Bootstrap-Werten von 96 - 100 % eindrucksvoll bestätigt. Ebenfalls bestätigt werden die Schwestergruppenverhältnisse zwischen den Südtiroler und den Südfranzösischen bzw. Südfranzösisch-Schweizer Populationen der Arten *I. lathonia* und *B. euphrosyne*.

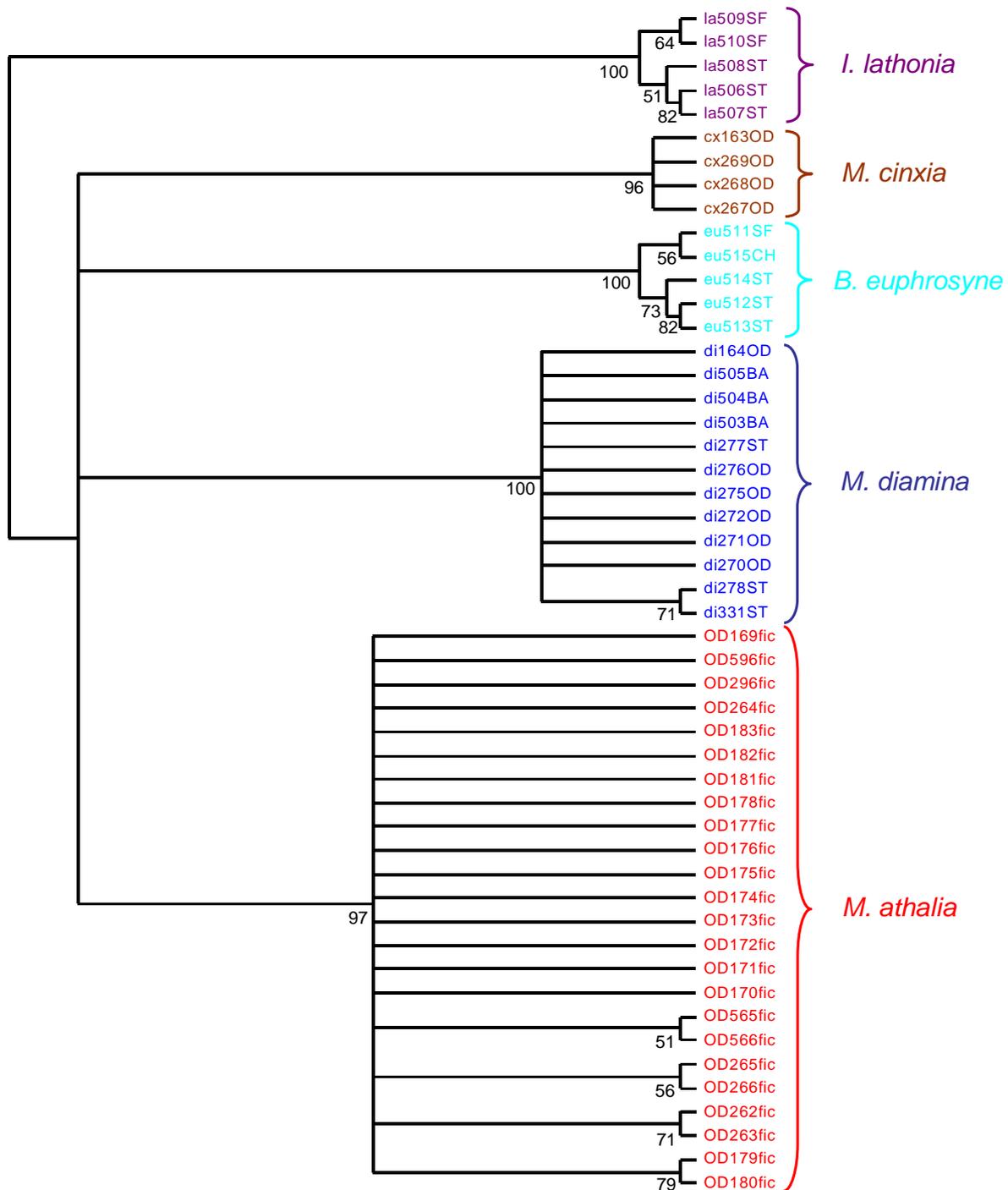


Abb. 3.18: Kladogramm der „Maximum Parsimony Bootstrap“-Analyse der Datenmatrix von 5 Nymphaliden-Arten, gewonnen von 8 ISSR-Primern.

Folgende Einstellungen galten für die heuristische Suche: „addseq=closest“, „branchswapping=tbr“. Es wurden 1000 Replikationen berechnet („nreps=1000“). Der „50%-majority-rule“ Konsensusbaum hat eine Länge von 1675 Schritten. Folgende Indizes wurden errechnet: $CI = 0,2167$, $CI_{excl} = 0,1861$, $HI = 0,7833$, $HI_{excl} = 0,8139$, $RI = 0,3722$, $RC = 0,0807$. Erläuterung: CI = Konsistenzindex, CI_{excl} = Konsistenzindex ohne nichtinformativ Merkmale, HI = Homoplasieindex, HI_{excl} = Konsistenzindex ohne nichtinformativ Merkmale, RI = Konservierungsindex, RC = berichtigter Konsistenzindex.

3.2.2 Intraspezifische Diversität bei *Melitaea athalia*

Für insgesamt 100 Individuen von *M. athalia* aus 8 Regionen konnten komplette ISSR-Datensätze analysiert werden. Abbildung 3.19 zeigt die Verteilung der untersuchten Regionen in Europa.

Die Analyse mit Hilfe von 9 Primern ergab innerhalb des Taxons *M. athalia* insgesamt 490 verschiedene ISSR-Banden und somit durchschnittlich 54 Banden pro Primer. Die geringste Anzahl wurde mit Primer UBC-865 erzielt ($n = 35$), doppelt so viele und damit die meisten Fragmente ($n = 70$) amplifizierte Primer UBC-810. Die Fragmentgrößen variierten von 200 bis 4500 bp. Die Polymorphismusrate betrug 99,8 % (Tab. 3.17).

Es konnte kein populationspezifischer Marker festgestellt werden. Alle Individuen konnten aufgrund ihres einzigartigen Bandenmusters identifiziert werden. Hierfür genügte bereits meist das Spektrum, das nur von einem Primer erzeugt wurde. Somit war die genotypische Diversität (Anzahl der Genotypen / Anzahl der Individuen) für jede Population 1,0.



Abb. 3.19: Untersuchte Regionen der *M. athalia*-Populationen in Europa

Betrachtet man die verschiedenen *M. athalia*-Populationen, so fällt auf, dass grundsätzlich bei allen Populationen, bei denen mehr als 5 Exemplare analysiert wurden, hohe Polymorphismuswerte von über 95 % erreicht werden. Die regional eng benachbarten Südfranzösischen Populationen werden mit Ausnahme der Clusteranalysen in den Abbildungen mit der Ligurischen

Population als Population „Südfrankreich/Ligurien“ zusammengefasst, da hier von einem geographisch und biotopmäßig ungehinderten Genaustausch ausgegangen werden kann. Da nur wenige Individuen von jedem dieser Fundorte zur Verfügung standen ($n = 3 - 7$), macht eine Gesamtbetrachtung dieser Populationen schon aus statistischen Gründen Sinn. Bei den folgenden Auswertungen wurden die Ergebnisse von Primer UBC-884 nicht berücksichtigt, da er nur sehr begrenzte Trennungseigenschaften aufwies. Abbildung 3.20 zeigt in graphischer Form die Beziehungen zwischen den polymorphen Loci, der Gendiversität h nach Nei (1973) und dem Diversitätsindex I nach Shannon. Wie bereits bei der Analyse der Arten sind auch innerhalb der *M. athalia*-Populationen die beiden Indizes miteinander korreliert. Der Polymorphismus ist bei allen Populationen sehr hoch und zeigt nur geringe Unterschiede.

Tab. 3.17: Auswertung der Loci, die von 8 ISSR-Primern für 8 *M. athalia*-Populationen gewonnen werden konnten.

Taxon	Populationen	Anzahl n	Anzahl Banden	Anzahl polymorpher Banden	pB in %	„gene diversity“ nach Nei (1973), h	Shannon's Diversitätsindex I
<i>athalia</i>	Fichtelberg	24	251	244	97,2	0,1594 (0,1280)	0,2765 (0,1757)
<i>athalia</i>	Brandenburg	5	123	112	91,1	0,2626 (0,1434)	0,4136 (0,1885)
<i>athalia</i>	Polen (Ost)	11	201	195	97,0	0,2327 (0,1413)	0,3773 (0,1820)
<i>athalia</i>	Finnland	4	113	104	92,0	0,3070 (0,1405)	0,4688 (0,1841)
<i>athalia</i>	Vorarlberg	9	192	186	96,9	0,2256 (0,1283)	0,3708 (0,1684)
<i>athalia</i>	Südtirol	6	119	113	95,0	0,2777 (0,1414)	0,4345 (0,1803)
<i>athalia</i>	Wallis	21	202	195	96,5	0,1943 (0,1400)	0,3241 (0,1871)
<i>athalia</i>	Ligurien	3	94	81	86,2	0,3083 (0,1484)	0,4651 (0,2070)
<i>athalia</i>	Tende Südfrankreich	4	66	49	74,2	0,2462 (0,1743)	0,3766 (0,2481)
<i>athalia</i>	St. Martin V. Südfrankreich	7	153	146	95,4	0,2289 (0,1263)	0,3754 (0,1643)
<i>athalia</i>	Peira Cava Lucéram Südfrankreich	7	189	181	95,8	0,2342 (0,1244)	0,3828 (0,1614)
<i>athalia</i>	Südfrankr./Lig. gesamt	21	272	267	98,2	0,1449 (0,1153)	0,2590 (0,1582)
<i>athalia</i>	gesamt	101	410	409	99,76	0,1132 (0,1115)	0,2073 (0,1623)

Erläuterung s. Tab. 3.4

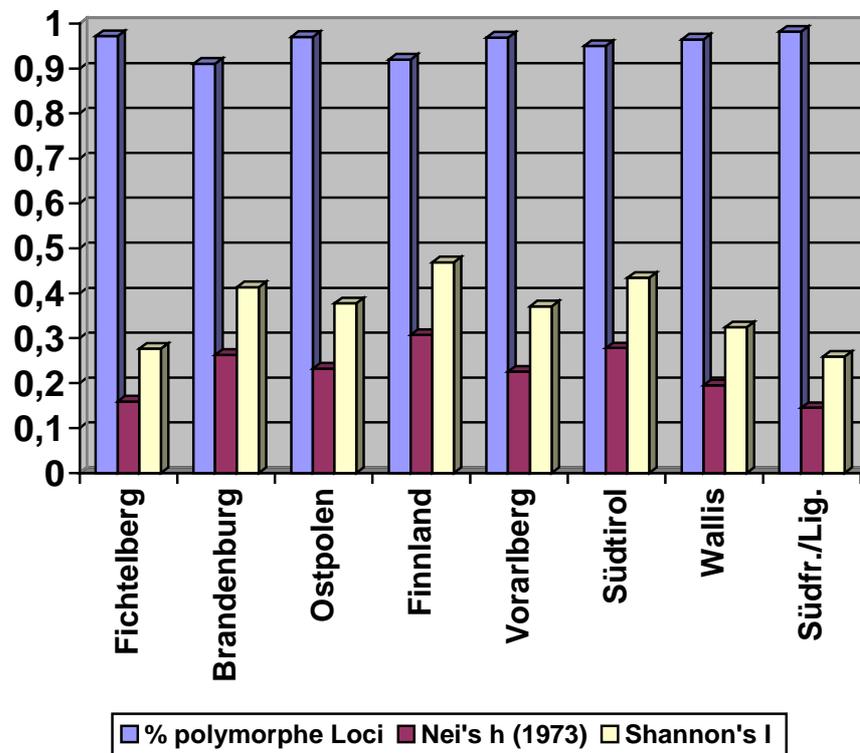


Abb. 3.20: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Analyse der Loci der 8 *M. athalia*-Populationen, die bei Anwendung von 8 ISSR-Primern erhalten wurden.

3.2.2.1 UPGMA-Clusteranalyse auf der Basis verschiedener Distanzmaße

Insgesamt liegen für 100 *M. athalia*-Individuen komplette Datensätze vor. Die Behandlung der ISSR-Daten erfolgte wie in 3.2.1.1 beschrieben. Auch hier wurden als Distanzmaße der Dice-, der Jaccard- sowie der Raup-Crick-Index verwendet.

Abbildung 3.21 zeigt das Ergebnis der UPGMA-Clusteranalyse auf Basis des Dice-Index. Schenkt man dem Teil der Südfranzösch-Ligurischen Population zwischen der Polnischen und Fichtelberg Population zunächst keine Beachtung so fallen drei „Großgruppen“ auf: Links oben eine „südliche“ Gruppe („Gruppe 2“ = „*celadussa*“), bestehend aus der Südtiroler, Walliser und dem größeren Teil der Südfranzösischen Population, daneben ein Bereich, der die beiden Ostdeutschen sowie die Vorarlberger und Finnische Population umfasst („Gruppe 1“ = „*athalia s. str.*“) sowie rechts die Polnische Gruppe („Gruppe 3“) mit einem Finnischen Tier. Zwischen der „*athalia s. str.*-Gruppe“ und der „Polen-Gruppe“ befindet sich ein Teil der Südfranzösischen Population, die zum größten Teil von Tieren aus Peira-Cava zusammengesetzt ist. Die Südtiroler, Walliser und Polnischen Populationen bilden jeweils geschlossene Einheiten, wenn man von

zwei Individuen der Südfranzösisch-Ligurischen Population absieht, die im Bereich der Südtiroler Tiere clustern. Die Anwendung des Jaccard-Index führt zu kleineren, aber doch unbedeutenden Verschiebungen einzelner Individuen, ohne jedoch das Ergebnis, das durch Berechnung des Dice-Index gewonnen wurde, wesentlich zu ändern (Abb. 3.22). Etwas anders sieht es aus, wenn der Raup-Crick-Index als Basis für die UPGMA gewählt wird (Abb. 3.23). Die bestehende Ordnung wird dadurch „gestört“, dass einzelne Individuen aus Ihrem Populationsverband „herausgerissen“ werden. Dennoch kann auch hier auf 3 Großgruppen geschlossen werden. Die Gruppe 3 (= „Polen-Gruppe“) clustert zusammen mit einem Finnischen Individuum (wie auch beim Dice- und Jaccard-Index), aber auch mit einem Walliser Tier („CH466ind“) und einem aus der Fichtelberg-Population („OD262fic“). Die Individuen „PL133bia“ und „PL367bia“ befinden sich in der Gruppe 2 („*celadussa*-Gruppe“), in der sich 4 von 6 Südtiroler und Walliser Tiere (bis auf „CH466ind“) befinden, daneben 18 von 21 Individuen aus Südfrankreich/Ligurien, sowie 3 vom Fichtelberg. Die Gruppe 1 („*athalia* s. str.“) enthält alle übrigen Tiere aus Finnland, Vorarlberg, Brandenburg, und vom Fichtelberg, dazu noch 2 Südtiroler und einen Französischen Falter. Im Gegensatz zu den Dice- bzw. Jaccard-Dendrogrammen bilden 5 Proben eine weitere Gruppe („Rest“), bestehend aus je zwei Südfranzösischen und Südtiroler Faltern und einem Vorarlberger Tier. Hervorzuheben ist die Verteilung der Südfranzösischen Falter im Raup-Crick-Dendrogramm: Fast 87 % der Stichprobe befindet sich in Gruppe 2 und signalisiert damit eine verwandschaftliche Nähe zur Walliser Gruppe, während es bei den Dice- / Jaccard-Bäumen nur ca. 62 % waren. Insgesamt ist jedoch die geographische Zuordnung der einhundert Stichproben zu den Gruppen bei Anwendung des Raup-Crick-Index unschärfer als bei den bekannten Dice- bzw. Jaccard-Indizes. Dies kann sicher durch das integrierte Bootstrap-Verfahren begründet werden (s. 2.3.3.4).

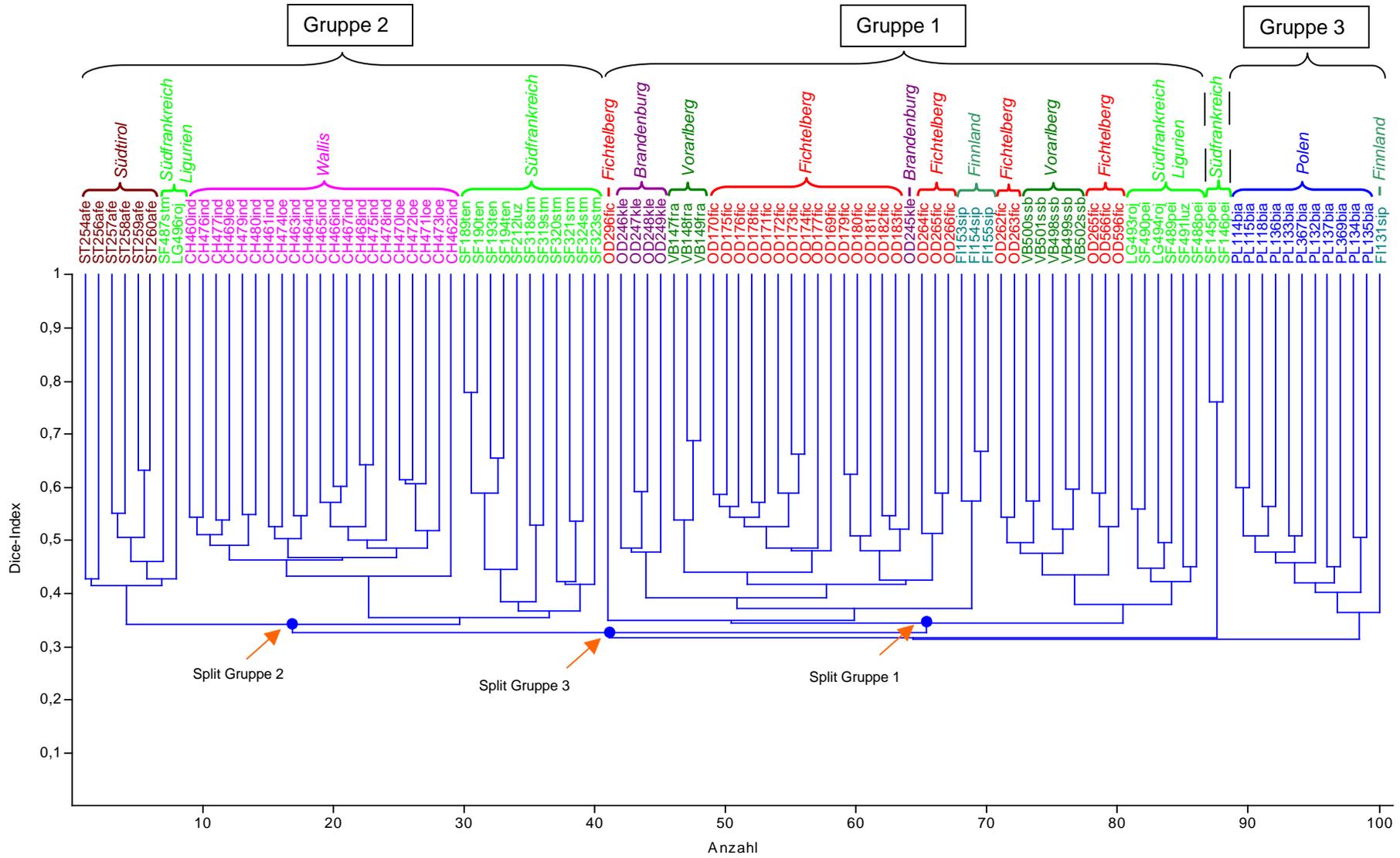


Abb. 3.21: UPGMA-Dendrogramm von 100 Individuen aus 8 *M. athalia* Populationen, basierend auf dem Dice-Index, der mit 8 Primern ermittelt wurde.

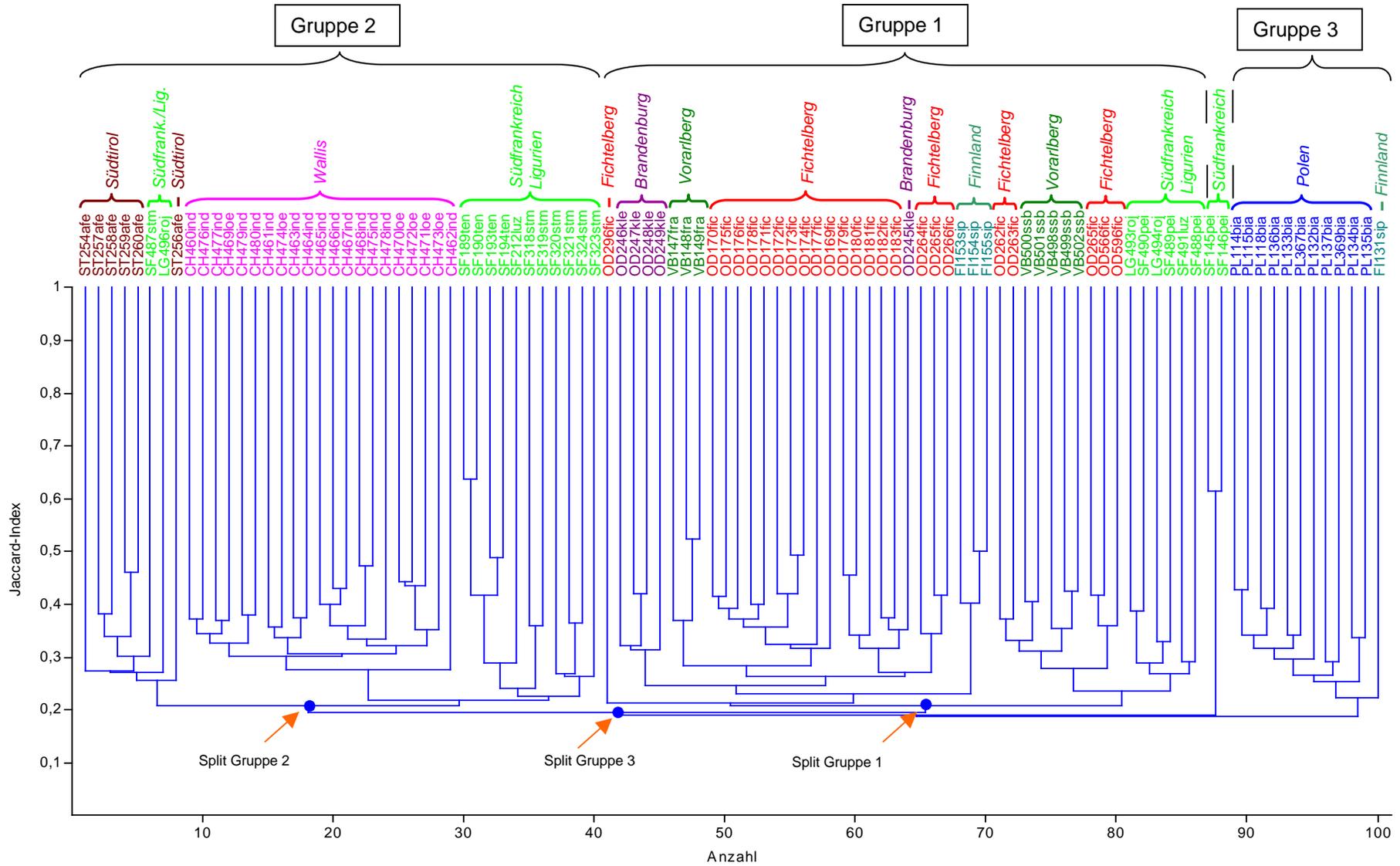


Abb. 3.22: UPGMA-Dendrogramm von 100 Individuen aus 8 *M. athalia*-Populationen, basierend auf dem Jaccard-Index, der mit 8 Primern ermittelt wurde.

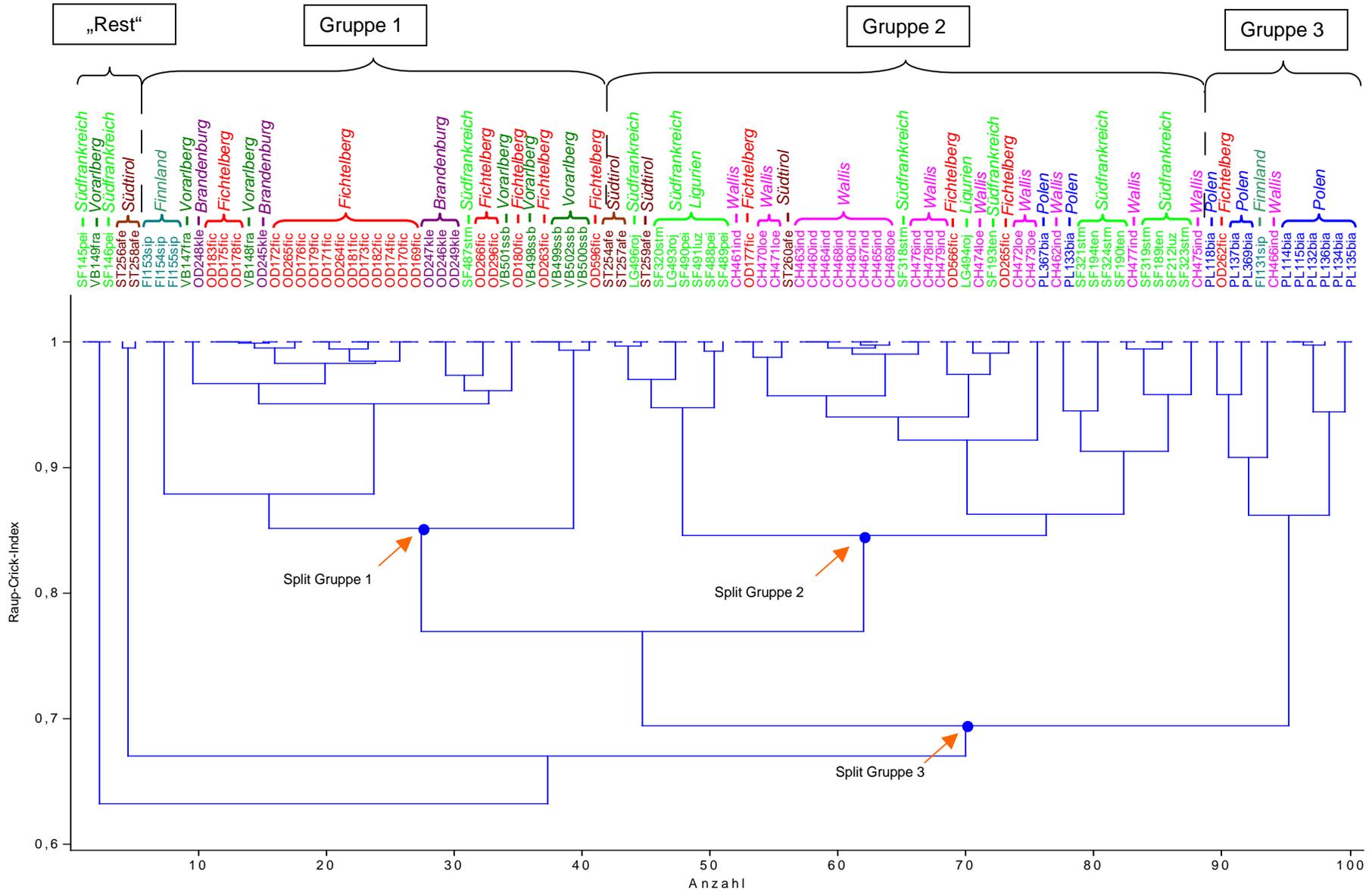


Abb. 3.23: UPGMA-Dendrogramm von 100 Individuen aus 8 *M. athalia*-Populationen, basierend auf dem Raup-Crick-Index, der mit 8 Primern ermittelt wurde

3.2.2.2 Hauptkoordinatenanalyse (PCO)

Durch Hauptkoordinatenanalysen ist es möglich, Daten zu reduzieren und Zusammenhänge zwischen ihnen auch optisch deutlich zu machen (s. 2.6.3.2). Analog zu den Untersuchungen auf Artniveau (s. 3.2.1.2) wurden entsprechende Analysen auf Populationsniveau durchgeführt. Auch hier wurden die Indizes nach Dice (Abb. 3.24 und Abb. 3.25), Jaccard (Abb. 3.26) und Raup-Crick (Abb. 3.27 und Abb. 3.28) verwendet.

Bei allen drei Verfahren gibt es Gemeinsamkeiten: So geht die Brandenburger Population immer in der Fichtelberg-Population auf, die ihrerseits weite Überschneidungen mit der Vorarlberger Population aufweist. Die Südtiroler Tiere befinden sich im Datenfeld der Südfranzösischen Falter. Beim Dice- und Jaccard-Index wird die Walliser Population deutlich von allen anderen getrennt, während sie beim Raup-Crick-Index (Abb. 3.27) im Bereich der Südfranzösischen Population zu finden ist. Die Auswertung auf Basis des Raup-Crick-Index (Abb. 3.27) kommt somit der klassischen Vorstellung von den Beziehungen zwischen den Populationen sehr nahe: Eine „Süd-Gruppe“ (= „*celadussa*-Gruppe“), bestehend aus den Populationen aus dem Wallis, Südfrankreich und Südtirol grenzt an eine „Nord-Gruppe“ (= „*athalia* s. str.-Gruppe“) mit den Populationen aus Vorarlberg, vom Fichtelberg und aus Brandenburg, mit geringfügigen Überschneidungen mit Individuen aus Vorarlberg. Die kleine Finnische Stichprobe ist separiert und befindet sich tendenziell in der Nähe zur Fichtelberg / Brandenburg / Vorarlberg-Gruppe, während die Polnische Population keine Überschneidungen mit den anderen Populationen aufweist. Die Polnische Gruppe wird als einzige auch von den 2. und 3. Koordinaten deutlich unterschieden. In dem Punkt stimmen alle 3 PCOs überein (Abb. 3.25, Abb. 3.26, linke Bildhälfte und Abb. 3.28). Grundsätzlich zeigt die Polnische Population in keinem Fall eine Nähe zur „Nord-Gruppe“. Auf Basis der 1. und 2. Koordinaten beim Dice- und Jaccard-Index gibt es geringfügige Kontakte zur „Süd-Gruppe“.

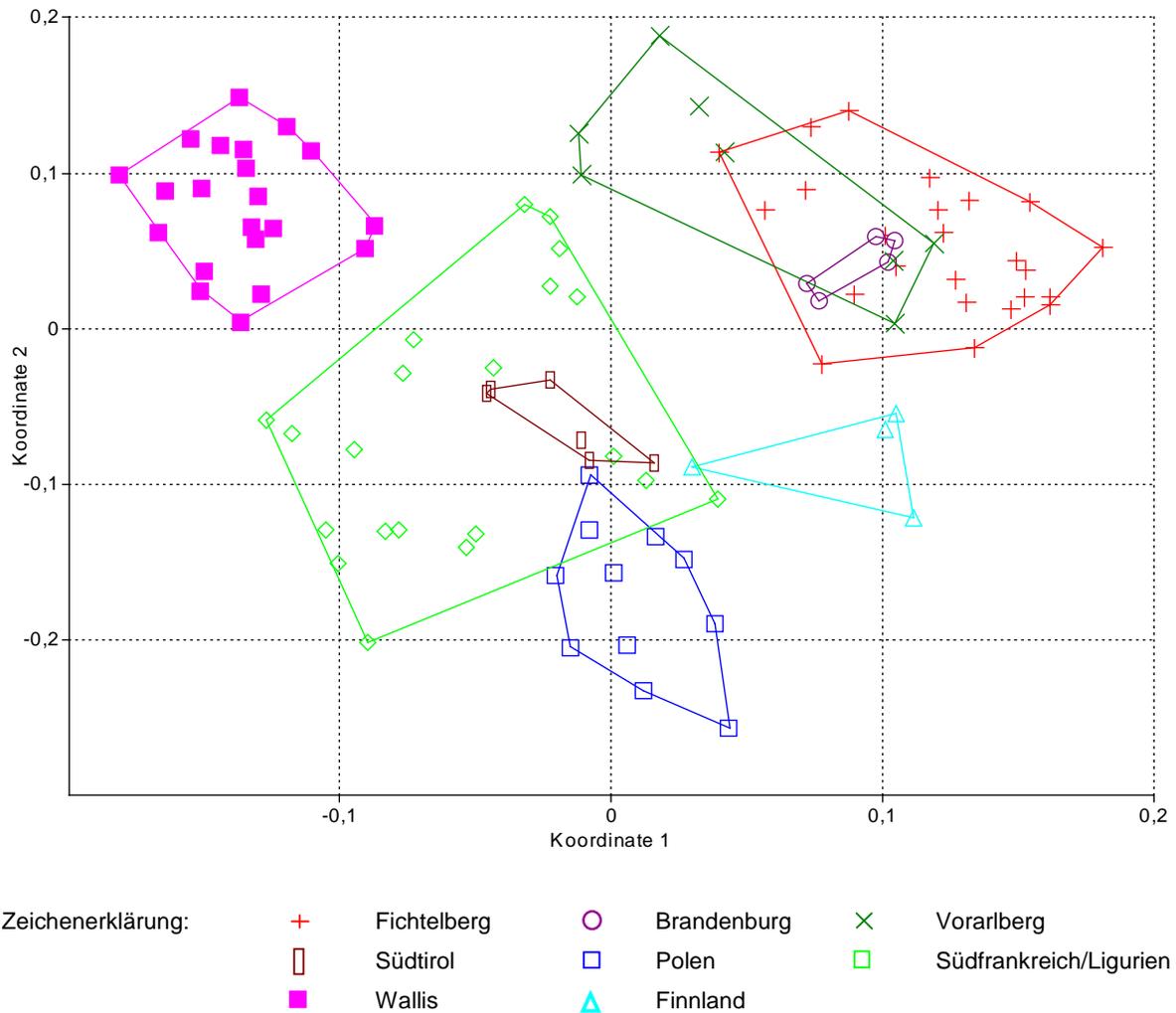
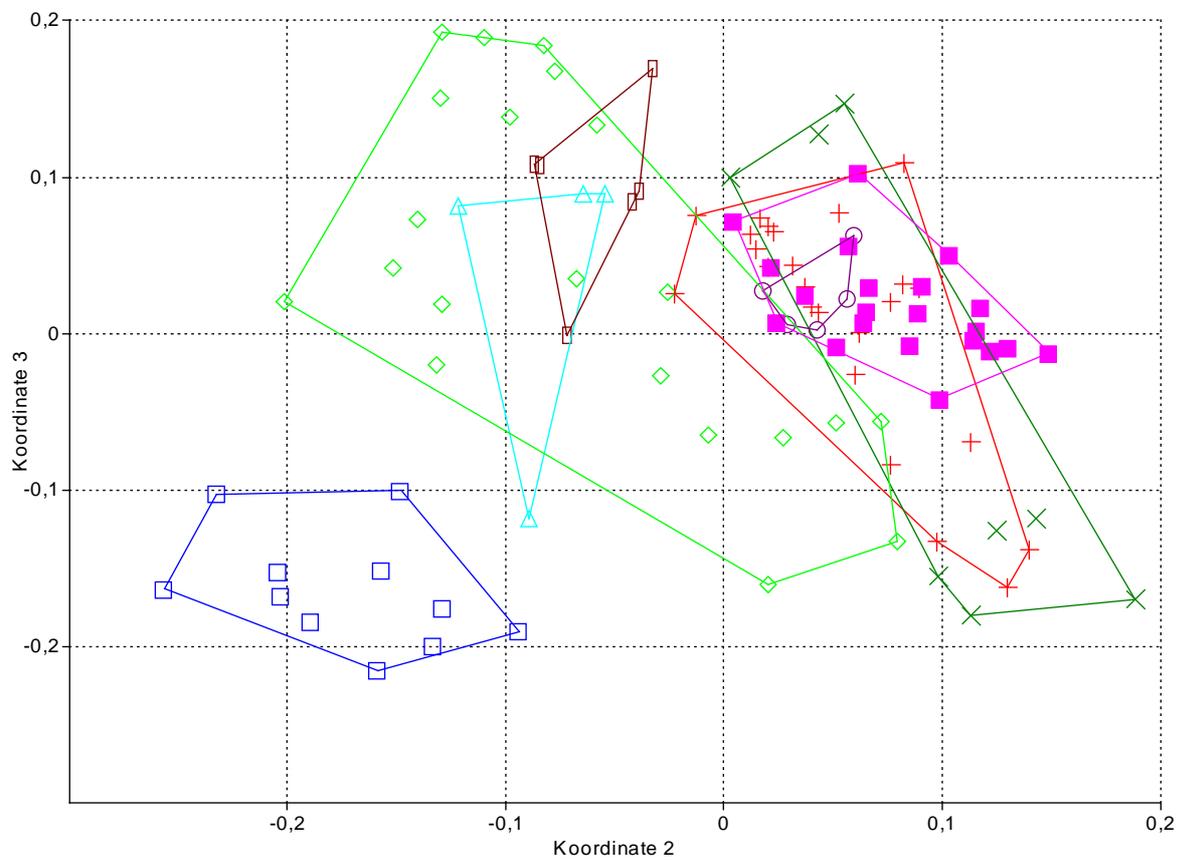


Abb. 3.24: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 1 und 2) auf Basis des Dice-Index.

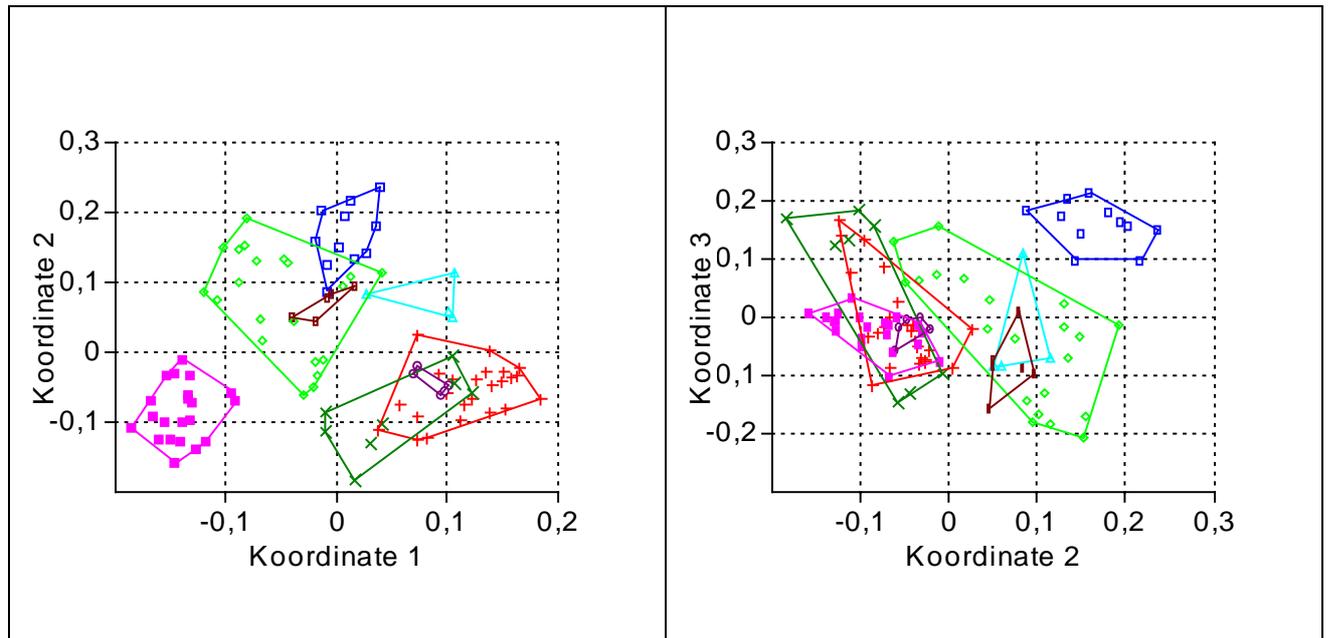
100 *M. athalia*-Individuen wurden untersucht und die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Populationen dargestellt. Die äußeren Punkte jeder Gruppe sind durch Linien miteinander verbunden. Die geographische Verteilung der Populationen ist Abb. 3.19 zu entnehmen.



Zeichenerklärung:

+	Fichtelberg	○	Brandenburg	×	Vorarlberg
▭	Südtirol	□	Polen	◻	Südfrankreich/Ligurien
■	Wallis	▲	Finnland		

Abb. 3.25: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 2 und 3) auf Basis des Dice-Index.



Zeichenerklärung:

+	Fichtelberg	○	Brandenburg	×	Vorarlberg
▭	Südtirol	□	Polen	◻	Südfrankreich/Ligurien
■	Wallis	▲	Finnland		

Abb. 3.26: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse auf Basis des Jaccard-Index.

Linke Hälfte: Basis Eigenwerte 1 und 2, rechte Hälfte: Basis Eigenwerte 2 und 3.

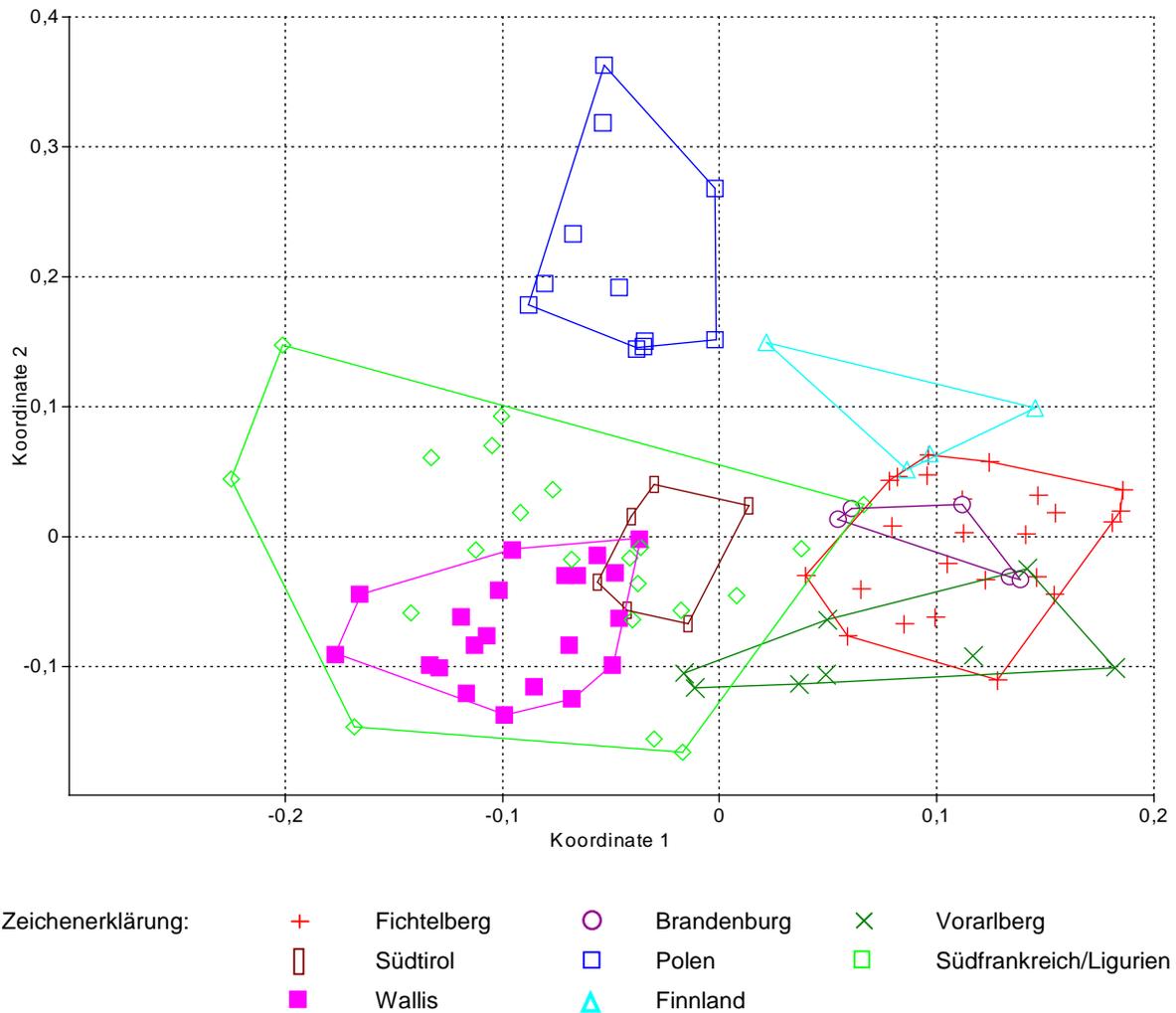
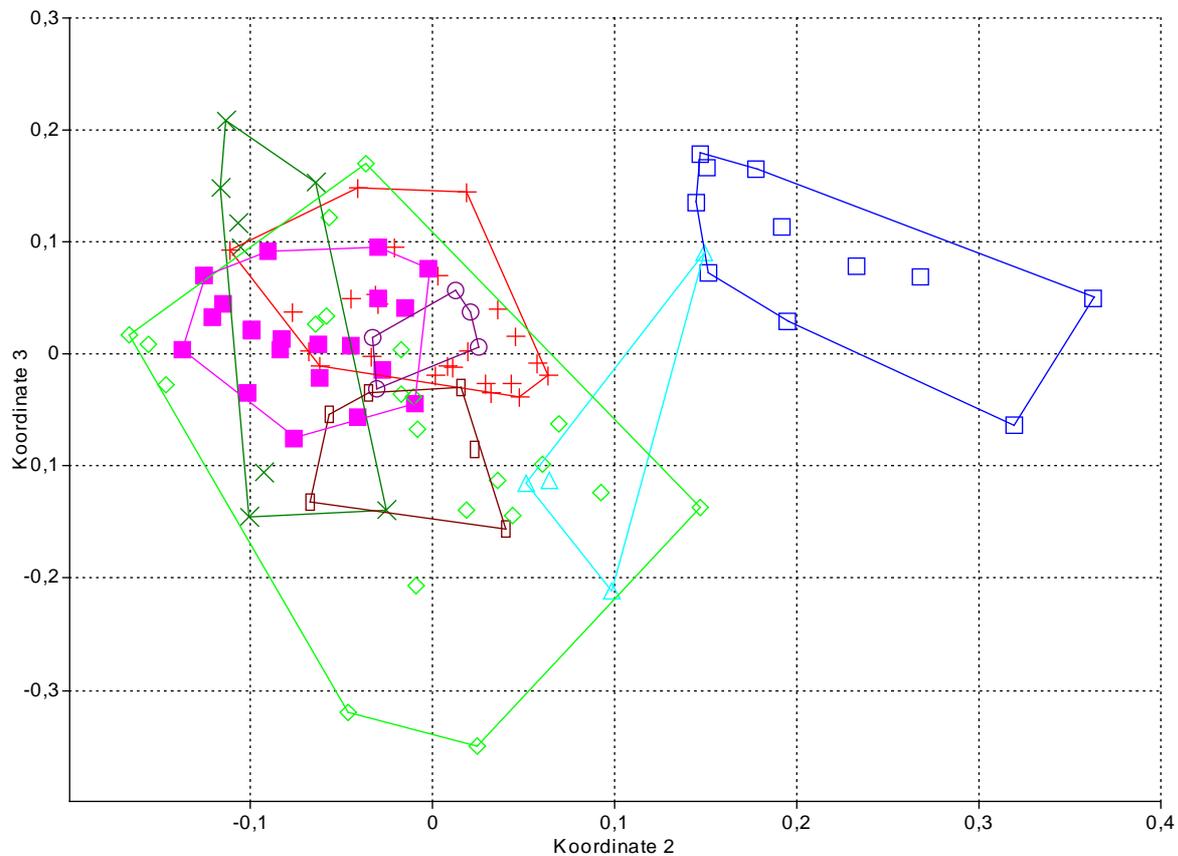


Abb. 3.27: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 1 und 2) auf Basis des Raup-Crick-Index.



Zeichenerklärung: + Fichtelberg ○ Brandenburg × Vorarlberg
 □ Südtirol □ Polen ◇ Südfrankreich/Ligurien
 ■ Wallis △ Finnland

Abb. 3.28: 2D-Blot der Eigenvektoren aus der Hauptkoordinatenanalyse (Eigenwerte 2 und 3) auf Basis des Raup-Crick-Index.

Tabelle 3.18 enthält zusammenfassend für alle drei Hauptkoordinatenanalysen die errechneten Eigenwerte nebst Varianzen der 8 *M. athalia*-Populationen.

Tab. 3.18: Eigenwerte und Varianzen der für 8 *M. athalia*-Populationen durchgeführten Hauptkoordinatenanalysen

	Dice		Jaccard		Raup-Crick	
	Wert	% Varianz	Wert	% Varianz	Wert	% Varianz
Eigenwert 1	3,98	6,04	3,32	4,20	9,45	6,57
Eigenwert 2	2,72	4,12	2,34	2,96	7,87	5,47
Eigenwert 3	2,54	3,85	2,22	2,81	6,51	4,53
Eigenwert 4	2,22	3,36	1,98	2,51	4,76	3,31

3.2.2.3 Verwandtschaftsbaumrekonstruktion durch „Maximum-Parsimony“

Mittels des „Maximum Parsimony“-Verfahrens (kurz: MP-Verfahren) sollte die kürzeste Topologie gefunden werden, die zu der vorliegenden Datenmatrix passt. Für die Berechnungen erwiesen sich 374 Merkmale als „parsimonie-informativ“. Es wurde eine heuristische Suche durchgeführt, die 141 gleich kurze Bäume mit einer Baumlänge von 3384 Schritten ergab. Daher wurden aus den gleich „sparsamen“ Topologien 2 Konsensusbäume berechnet, einer nach der 50 %-Mehrheitsregel („50 %-majority-rule“), einer als strikter Konsensusbaum. Als Außengruppe und somit zur Wurzelung des Baumes dienten die 12 Individuen von *M. diamina*. Diese Art hat sich bei den vorhergehenden Untersuchungen als nächster Verwandter zu *M. athalia* erwiesen, wenn man von *M. aurelia* absieht. Da von *M. aurelia* nur 3 Individuen vorlagen, die zudem nicht mit allen ausgewählten Primern auswertbare Marker lieferten, musste auf dieses Taxon als denkbare Außengruppe verzichtet werden.

Das basalste Taxon ist eine Stichprobe vom Fichtelberg („OD296fic“). Der „50 %-Mehrheitsregel-Baum“ zeigt vier polytome Verzweigungen. In Abbildung 3.29 sind diese als Gruppe 2c und 2b gekennzeichnet, dazu ein Zweig, der die Gruppen 1, 2a und 3 umfasst. Die vierte Polytomie findet sich innerhalb der Gruppe 1 und betrifft 2 Teilgruppen der Fichtelberg-Population sowie die Vorarlberger Falter aus Frastanz. Gruppe 2b enthält die Walliser Population als Monophylum innerhalb eines Teils der Südfranzösischen Population. 2 Individuen aus Südfrankreich bilden die Gruppe 2c. Die Polnische Population bildet zusammen mit einem Finnischen Tier (FI131sip) die basale Gruppe („Gruppe 3“) innerhalb eines Astes, der 2 weitere Gruppen („2a“ und „1“) umfasst. Die „Gruppe 2a“ umfasst alle Südtiroler, dazu die restlichen Südfranzösisch/Ligurischen und Finnischen Tiere und ist somit vergleichsweise heterogen zusammengesetzt. Die letzte Gruppe wird - abgesehen von der erwähnten Ausnahme „Odfic296“- ausschließlich von den Populationen vom Fichtelberg, aus Brandenburg und Vorarlberg gebildet. Die Verteilung der Südfranzösischen Proben ist uneinheitlich und weist somit auch auf genetische Überlappungen mit den nördlich der Alpen verbreiteten Populationen hin. Beim „strict consensus“-Baum (Abb. 3.30) treten erwartungsgemäß zahlreiche Polytomien auf. Dennoch bleiben wesentliche Strukturen des „50%-majority-rule“-Baumes erhalten. Die Gruppen 2a, 2b, 2c und 3 bleiben monophyletisch. Die „Gruppe 1“ zerfällt in insgesamt 8 polytome Einheiten. Aus Orientierungsgründen sind die Gruppenbezeichnungen des „50 %-majority-rule“-Baumes auf den „strict consensus“-Baum übertragen worden.

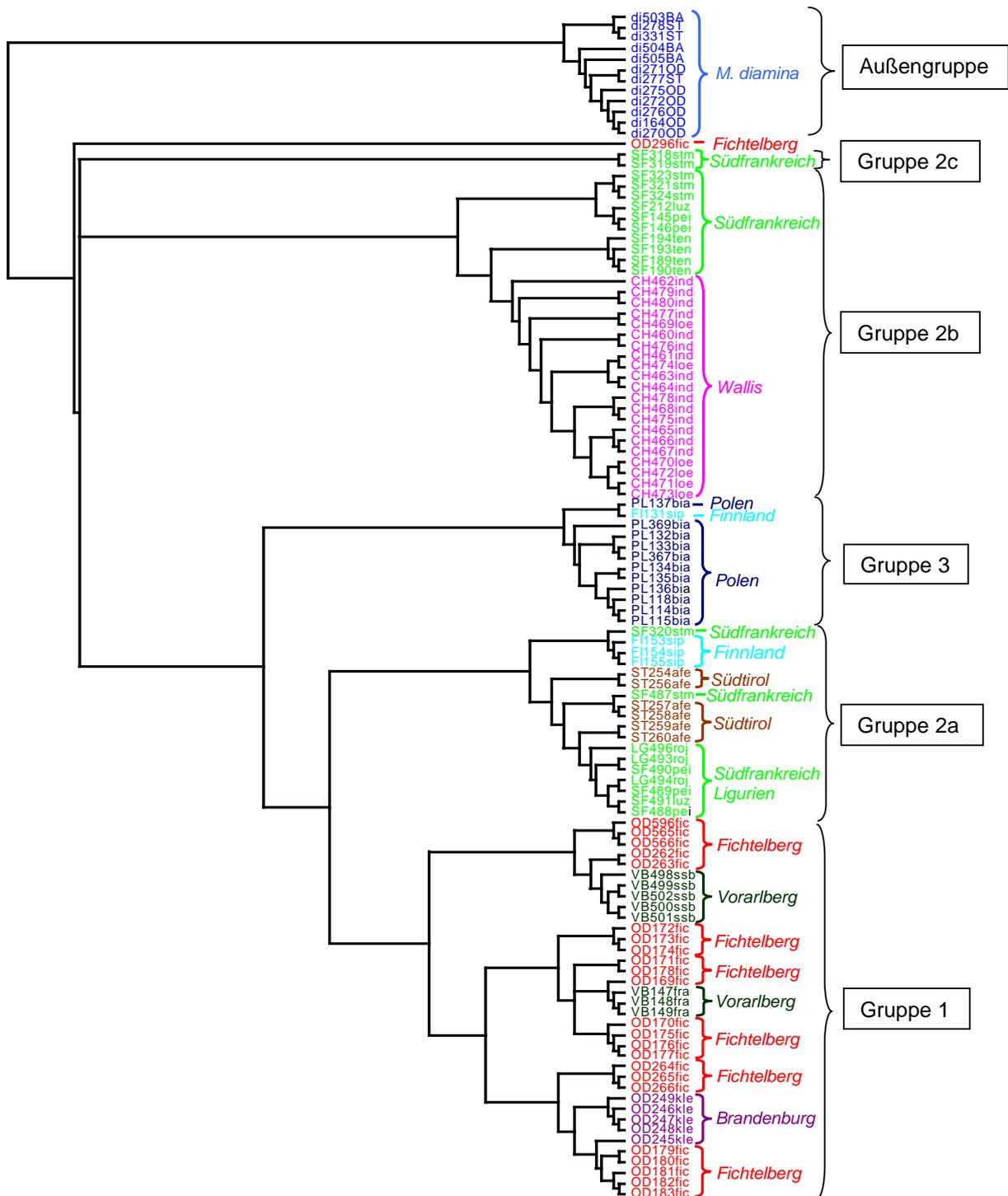


Abb. 3.29: „50%-majority-rule-Baum“ der „Maximum Parsimony“-Analyse der Datenmatrix von 100 Individuen von *M. athalia* aus 8 Regionen, auf Basis der Marker von 8 ISSR-Primern.

Die Außengruppe wird von 12 Faltern von *M. diamina* gebildet. Einstellungen für die heuristische Suche: „addseq = random“, „branchswapping = tbr“, „nreps = 1000“. Somit wurden 1000 Replikationen berechnet. Das Konsensuskladogramm wurde aus 141 verschiedenen Bäumen mit einer Länge von 3384 Schritten gewonnen. Folgende Indizes wurden errechnet: $CI = 0,1256$, $CI_{excl} = 0,1122$, $HI = 0,8744$, $HI_{excl} = 0,8878$, $RI = 0,3734$, $RC = 0,0469$. Erläuterung: CI = Konsistenzindex, CI_{excl} = Konsistenzindex ohne nichtinformativ Merkmale, HI = Homoplasielindex, HI_{excl} = Konsistenzindex ohne nichtinformativ Merkmale, RI = Konservierungsindex, RC = berichtigter Konsistenzindex.

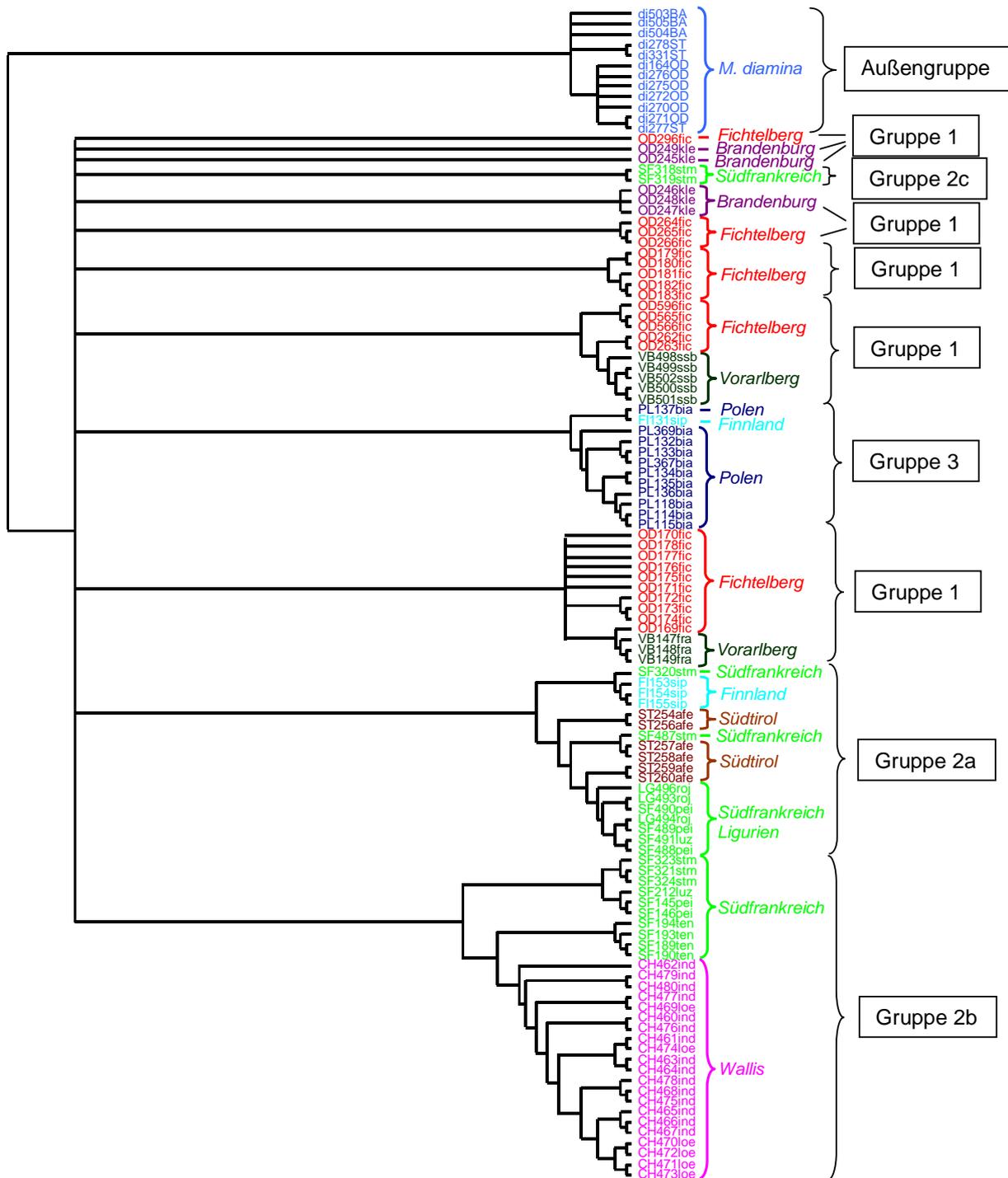


Abb. 3.30: „Strict-consensus-Baum“ der „Maximum Parsimony“-Analyse der Datenmatrix von 100 Individuen von *M. athalia* aus 8 Regionen, auf Basis der Marker von 8 ISSR-Primern.

Die Außengruppe wird von 12 Faltern von *M. diamina* gebildet. Einstellungen für die heuristische Suche: „adseq = random“, „branchswapping = tbr“, „nreps = 1000“. Somit wurden 1000 Replikationen berechnet. Das Konsensuskladogramm wurde aus 141 verschiedenen Bäumen mit einer Länge von 3384 Schritten gewonnen. Folgende Indizes wurden errechnet: $CI = 0,1256$, $CI_{excl} = 0,1122$, $HI = 0,8744$, $HI_{excl} = 0,8878$, $RI = 0,3734$, $RC = 0,0469$. Erläuterung: CI = Konsistenzindex, CI_{excl} = Konsistenzindex ohne nichtinformativ Merkmale, HI = Homoplasieindex, HI_{excl} = Konsistenzindex ohne nichtinformativ Merkmale, RI = Konservierungsindex, RC = berichtigter Konsistenzindex.

3.2.2.4 Genetische Variation zwischen Fundorten, Populationen und Regionen

Um die genetische Variation der *M. athalia*-Proben zwischen den Fundorten, Populationen und Regionen zu untersuchen, wurden verschiedene Varianzanalysen durchgeführt. Solche Varianzanalysen geben Aufschluss darüber, ob und wie die Stichproben genetisch strukturiert sind und wie groß das Ausmaß der jeweiligen genetischen Variation auf den verschiedenen Hierarchieebenen ist. Das führende Softwareprogramm zur Berechnung einer „AMOVA“ („Analysis of Molecular Variance“) heißt „ARLEQUIN“ (Schneider et al. 2005). Grundsätzlich berechnet das Programm Varianzen aufgrund der „Quadratischen Euklidischen Distanz“. Nach Huff et al. (1993) sind die genetische Distanz nach Nei & Li (1979) und die euklidische Distanz D nahezu austauschbar.

In die Untersuchung wurden nur Stichproben einbezogen, die über einen kompletten Datensatz verfügten, d. h. die auswertbare Banden bei jedem der acht Primer erzeugten.

Insgesamt wurden 100 Falter von 14 Fundorten untersucht. Bedingt durch die räumliche Nähe mancher Fundorte (Abstand < 30 km Luftlinie) wurden diese wie in den bisherigen Analysen zu insgesamt 8 Populationen zusammengefasst, wenn aufgrund der bekannten Verbreitung davon ausgegangen werden konnte, dass es sich im betreffenden Gebiet um zusammenhängende Populationen handelt.

3.2.2.4.1 AMOVA von 14 Einzelfundorten ohne Berücksichtigung der räumlichen Nähe

Die Totalvarianz der zum Teil eng beieinander liegenden Fundorte beträgt zwischen den Populationen 18,1 %, 81,9 % entfallen auf individuelle Unterschiede innerhalb der Populationen.

Tab. 3.19: AMOVA der 14 Fundorte von *M. athalia*

Variationsquelle	d.f.	SSD	Varianzkomponenten	Varianz (%)	P-Werte	F-Indizes
Zwischen 14 Fundorten	13	956,7	6,5	18,1	< 0,001	$F_{st} = 0,181$
Innerhalb der 14 Fundorte	86	2530,6	29,43	81,9	< 0,001	

Erläuterung der in den Tabellen 3.19, 3.20, 3.22, 3.23 und 3.24 verwendeten Abkürzungen:

d.f.	= Freiheitsgrad („degree of freedom“): Individuenzahl – 1
SSD	= Summe der Abweichungsquadrate vom Mittelwert („Sum of Squares“)
Varianz (%)	= Anteil in % an der Gesamtvarianz innerhalb von Populationen
P-Werte	= Signifikanztests nach 1023 Permutationen
F_{ct}	= Verhältnis der Differenzierung zwischen beiden Taxa
F_{sc}	= Differenzierung zwischen den Populationen innerhalb der beiden Taxa
F_{st}	= Gesamtdifferenzierung der Populationen

3.2.2.4.2 AMOVA der zu 8 Regionen zusammengefassten Fundorte

Fasst man die 14 Fundorte zu 8 Regionen zusammen, erhöht sich die Varianz innerhalb der Populationen auf 84,99 %, entsprechend beträgt sie zwischen den Regionen nur noch 15,01 %.

Tab. 3.20: AMOVA der zu 8 Regionen zusammengefassten Fundorte von *M. athalia*

Variationsquelle	d.f.	SSD	Varianzkomponenten	Varianz (%)	P-Werte	F-Indizes
Zwischen 8 Regionen	7	670,5	5,43	15,01	< 0,001	$F_{st} = 0,1501$
Innerhalb der 8 Regionen	93	2859,7	30,75	84,99	< 0,001	

Erläuterung der Abkürzungen s. Tab. 3.19

3.2.2.4.3 UPGMA-Clusteranalyse auf Basis errechneter F_{st} -Werte

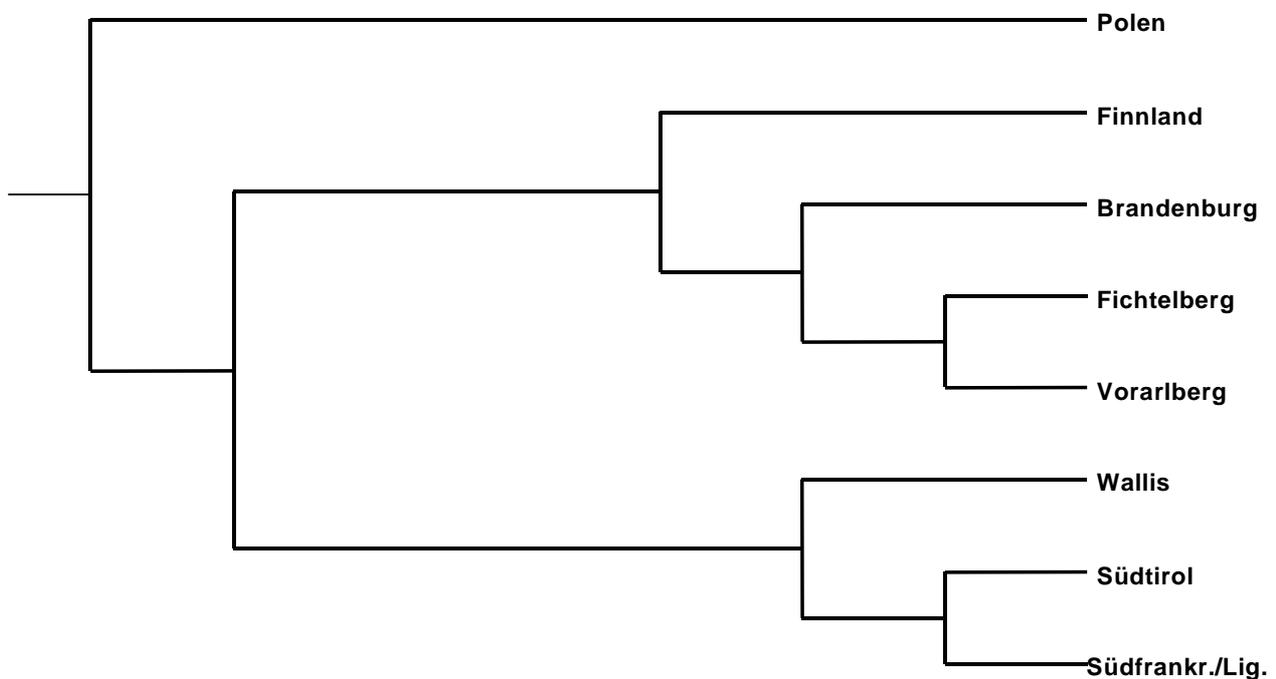
In einem weiteren Schritt wurde analysiert, wie groß die Unterschiede zwischen den Regionen sind, welche Regionen sich von anderen deutlicher und in welchem Ausmaß unterscheiden. Aufgrund des paarweisen Vergleichs der durch *ARLEQUIN* berechneten F_{st} -Werte ergibt sich, dass die Populationen Brandenburg, Fichtelberg und Vorarlberg die geringsten Unterschiede zueinander aufweisen, während der höchste Wert zwischen der Finnischen und Walliser Population gefunden wird. Die Werte in Tabelle 3.21 sind alle signifikant ($P < 0,05$; 1023 Permutationen).

Tab. 3.21: Matrix der F_{st} Werte für 8 Regionen

	Fichtelberg	Brandenbg.	Polen	Finnland	Vorarlberg	Südtirol	Wallis	Südfr./Lig.
Fichtelberg	0.00000							
Brandenbg.	0.08912	0.00000						
Polen	0.17189	0.19722	0.00000					
Finnland	0.13436	0.19731	0.16815	0.00000				
Vorarlberg	0.07601	0.14093	0.18794	0.14825	0.00000			
Südtirol	0.16800	0.18831	0.20842	0.21415	0.19470	0.00000		
Wallis	0.17807	0.20078	0.21117	0.23645	0.16678	0.18478	0.00000	
Südfr./Lig.	0.12062	0.16640	0.14743	0.14876	0.11052	0.10505	0.11276	0.00000

Die berechneten Werte wurden einer UPGMA-Clusteranalyse unterworfen. Aus dem errechneten Dendrogramm (Abb. 3.31) ergibt sich eine Dreiteilung der 8 Regionen:

1. Populationen südlich des Hauptalpenkammes: Südfrankreich/Ligurien, Südtirol, Wallis („*celadussa*-Gruppe“)
2. Mittel- und nordeuropäische Populationen: Vorarlberg, Sachsen (Fichtelberg), Brandenburg und Finnland („*athalia*“-Gruppe)
3. Osteuropa, vertreten durch die polnische Populationen nahe der weißrussischen Grenze („Polen“-Gruppe)



sehr hoher Anteil von 83,16 % entfällt demnach auf Unterschiede innerhalb der Populationen, 10,7 % werden von den Populationen innerhalb der 3 Hauptregionen gedeckt, und nur 6,1 % werden auf Unterschiede zwischen den Hauptregionen zurückgeführt (Tab. 3.22).

Tab. 3.22: AMOVA der 3 Hauptregionen von *M. athalia*

Variationsquelle	d.f.	SSD	Varianz-komponenten	Varianz (%)	P-Werte	F-Indizes
Zwischen den 3 Hauptregionen	2	311,1	2,26	6,13	<0,001	
Zwischen den Populationen innerhalb der 3 Hauptregionen	5	363,4	3,94	10,7		$F_{sc} = 0,1140$ $F_{st} = 0,1684$ $F_{ct} = 0,0614$
Innerhalb der 3 Hauptregionen	92	2820,4	30,66	83,16		
TOTAL	99	3494,9	36,86			

Erläuterung der Abkürzungen s. Tab. 3.19

3.2.2.4.5 Weitere AMOVA-Untersuchungen

Des weiteren wurde untersucht, wie sich die Varianzen der Region „Nord“ („athalia s. str.“) gegenüber denen der anderen Populationen verhält.

Es zeigt sich, dass die geringsten Unterschiede zur Südfranzösischen (2,9 %) und zur Südtiroler Gruppe (6,75 %) bestehen. In beiden Fällen übersteigt die Varianz innerhalb der „Nord“-Region (10,04 % bzw. 10,3 %) die jeweilige Varianz zu den beiden anderen Populationen. Stärker differenziert zeigen sich die Polnische und die Walliser Populationen zur „Nord“-Region, wobei die genetische Variation zwischen der „Nord“-Region und der Polnischen Population 9,38 % und zwischen der „Nord“-Region und der Walliser Population 7,99 % beträgt. Die größten Varianzen zeigen sich zwischen folgenden Populationen:

Polen – Wallis 21,12 %

Polen – Südtirol 20,84 %

Polen – Südfrankreich 14,74 %

Alle Werte erwiesen sich als hochsignifikant ($P < 0,001$), was bedeutet, dass die hier beobachtete Verteilung der Individuen in den jeweiligen Populationen das größtmögliche Quantum an genetischer Struktur wiedergibt.

Tab. 3.23: Ergebnisse der Varianzanalysen (AMOVA) zwischen der „Nord“-Gruppe und 4 anderen Populationen von *M. athalia*

Variationsquelle	d.f.	SSD	Varianz-komponenten	Varianz (%)	P-Werte	F-Indizes
Zwischen „Nord“ und 4 Populationen	4	483,7	2,17	5,96	< 0,001	
Zwischen den Populationen innerhalb der Gruppen	3	180,6	3,64	9,99	< 0,001	$F_{sc} = 0,1063$ $F_{st} = 0,1595$ $F_{ct} = 0,0596$
Innerhalb der Populationen	92	2820,4	30,66	84,05	< 0,001	
Zwischen „Südfrankreich“ und „Nord“	1	129,9	1,04	2,9	< 0,001	
Zwischen den Populationen innerhalb der Gruppen	3	180,9	3,59	10,04	< 0,001	$F_{sc} = 0,1034$ $F_{st} = 0,1294$ $F_{ct} = 0,0290$
Innerhalb der Populationen	57	1773,9	31,12	87,06	< 0,001	
Zwischen „Südtirol“ und „Nord“	1	83,0	2,44	6,75	< 0,001	
Zwischen den Populationen innerhalb der Gruppen	3	180,6	3,73	10,3	< 0,001	$F_{sc} = 0,1105$ $F_{st} = 0,1706$ $F_{ct} = 0,0675$
Innerhalb der Populationen	42	1259,9	30,00	82,94	< 0,001	
Zwischen „Wallis“ und „Nord“	1	184,1	2,93	7,99	< 0,001	
Zwischen den Populationen innerhalb der Gruppen	3	180,9	3,72	10,15	< 0,001	$F_{sc} = 0,1104$ $F_{st} = 0,1815$ $F_{ct} = 0,0800$
Innerhalb der Populationen	57	1710,8	30,01	81,85	< 0,001	
Zwischen „Polen“ und „Nord“	1	137,6	3,63	9,38	< 0,001	
Zwischen den Populationen innerhalb der Gruppen	3	180,86	3,54	9,15	< 0,001	$F_{sc} = 0,1009$ $F_{st} = 0,1853$ $F_{ct} = 0,0938$
Innerhalb der Populationen	47	1481,4	31,52	81,47	< 0,001	

Erläuterung der Abkürzungen s. Tab. 3.19

Tab. 3.24: Ergebnisse der Varianzanalysen (AMOVA) zwischen der Polnischen, Walliser, Südtiroler und Südfranzösisch-Ligurischen Population

Variationsquelle	d.f.	SSD	Varianz-komponenten	Varianz (%)	P-Werte	F-Indizes
Zwischen „Südfrankreich/Ligurien“ und „Südtirol“	1	64,0	3,58	10,51	< 0,001	$F_{st} = 0,1051$
Innerhalb der Populationen	25	763,4	30,54	89,49	< 0,001	
Zwischen „Südfrankreich/Ligurien“ und „Wallis“	1	111,4	3,9	11,3	< 0,001	$F_{st} = 0,1128$
Innerhalb der Populationen	40	1240,3	30,4	88,7	< 0,001	
Zwischen „Südfrankreich/Ligurien“ und „Polen“	1	114,8	5,68	14,74	< 0,001	$F_{st} = 0,1474$
Innerhalb der Populationen	30	984,9	32,83	85,26	< 0,001	
Zwischen „Polen“ und „Wallis“	1	149,5	8,23	21,12	< 0,001	$F_{st} = 0,2112$
Innerhalb der Populationen	30	921,8	30,73	78,88	< 0,001	
Zwischen „Polen“ und „Südtirol“	1	95,6	8,27	20,84	< 0,001	$F_{st} = 0,2084$
Innerhalb der Populationen	15	470,9	31,39	79,16	< 0,001	
Zwischen „Wallis“ und „Südtirol“	1	87,3	6,35	18,48	< 0,001	$F_{st} = 0,1848$
Innerhalb der Populationen	25	700,3	28,01	81,52	< 0,001	

Erläuterung der Abkürzungen s. Tab. 3.19

3.2.2.4.6 Genfluß zwischen den Populationen

Als Maß für einen möglichen Genfluß zwischen den Populationen gilt der mit den F_{st} -Werten im Zusammenhang stehende Wert Nm , der die Anzahl von Immigranten pro Generation wiedergibt. Tabelle 3.25 gibt die entsprechenden Werte wieder. Dabei zeigt sich, dass grundsätzlich bei allen Populationen von einem recht hohen Genfluß ausgegangen werden kann. Keine der untersuchten Populationen weist eine isolierte Situation auf. Besonders intensiv ist die Verbindung der Fichtelberg- mit der Vorarlberger Population in Richtung Süden ($Nm = 7$) sowie mit der Brandenburger Population ($Nm > 5$) im Norden. Trotz der geographisch hervorgehobenen Lage der Population des Fichtelberges, der mit 1115 m auch gleichzeitig die höchste Erhebung Ostdeutschlands darstellt, ist diese Population keineswegs isoliert. Der durchschnittliche Nm -Wert für alle Populationen beträgt 2,97.

Tab. 3.25: Matrix der Nm -Werte, die auf Basis der F_{st} -Werte berechnet wurden.

	Fichtelberg	Brandenbg.	Polen	Finnland	Vorarlberg	Südtirol	Wallis	Südfr./Lig.
Fichtelberg	0							
Brandenbg.	5,1	0						
Polen	2,4	2,0	0					
Finnland	3,2	2,0	2,5	0				
Vorarlberg	7,0	3,5	2,3	3,3	0			
Südtirol	2,5	2,2	1,9	1,8	2,5	0		
Wallis	2,3	2,0	1,9	1,6	2,7	2,2	0	
Südfr./Lig.	3,7	2,5	2,9	2,9	5,0	4,3	3,9	0

3.2.2.4.7 Korrelation zwischen genetischer und geographischer Distanz

Um einen Zusammenhang zwischen genetischer und geographischer Distanz zu überprüfen, wurde ein Mantel-Test durchgeführt. Ausgangsbasis hierfür waren zum einen die aus den errechneten F_{st} -Werten gewonnene Distanzmatrix, zum anderen eine geographische Distanzmatrix, welche die Abstände der verschiedenen Populationen zueinander - gemessen in Kilometer Luftlinie – enthält (Tab. 3.26). Populationen, die weniger als 30 km Luftlinie voneinander entfernt sind, wurden analog zu den bisherigen Berechnungen zu einer Gesamtpopulation zusammengefasst. Deren geographischer Mittelpunkt diente als Messpunkt für die Berechnung der Abstände. Die Abstandswerte wurden mit Hilfe des Internetprogramms http://www.karomue.privat.t-online/nav/Entfernung_2.xls direkt aus den Fundortkoordinaten berechnet.

Tab. 3.26: Matrix der geographischen Distanzen zwischen 8 Populationen. Die Zahlen geben die Abstände in Kilometer Luftlinie wieder

	Fichtelberg	Brandenbg.	Polen	Finnland	Vorarlberg	Südtirol	Wallis	Südfr./Lig.
Fichtelberg	0							
Brandenbg.	237	0						
Polen	798	678	0					
Finnland	1335	1103	841	0				
Vorarlberg	428	650	1182	1748	0			
Südtirol	427	656	1104	1743	162	0		
Wallis	593	804	1360	1905	182	307	0	
Südfr./Lig.	812	1048	1544	2139	402	450	266	0

Für den Mantel-Test wurde das Programm „zt 1.0“ (Bonnet & Van de Peer 2002) eingesetzt. Zur statistischen Absicherung wurden 10000 Randomisierungen durchgeführt.

Die beobachtete Korrelation betrug $r = 0,40$ bei einem p-Wert von 0,04. Damit ist ein Zusammenhang zwischen den beobachteten genetischen Distanzen und den geographischen Abständen bewiesen, da der Wert signifikant von Null verschieden ist.

4. Diskussion

4.1 Einleitung

Die geographische Situation und die damit verbundenen morphologischen Unterschiede innerhalb des Taxons *Melitaea athalia* sowie die Schwierigkeiten, die Arten dieser Gattung überhaupt voneinander zu unterscheiden, haben diese Gruppe zu einem hochinteressanten Forschungsobjekt gemacht. Die bisherigen Untersuchungen auf molekulargenetischer Basis umfassen die Analyse der mitochondrialen Gene COI und 16S (Wahlberg & Zimmermann 2000) sowie der nukleären Gene „EF-1 α “ und „wingless“ (Wahlberg, in Ehrlich & Hanski 2004) und beschäftigten sich in erster Linie mit der Verwandtschaft der verschiedenen Arten, Tribi, Subtribi und Unterfamilien untereinander. Eine umfangreiche Analyse verschiedener Populationen einer der variabelsten Schreckenfallerarten *M. athalia* wird hiermit zum ersten Mal durchgeführt.

Da zu der gewählten Untersuchungsmethode, der ISSR-PCR, im Zusammenhang mit Lepidopteren nur sehr wenige Veröffentlichungen vorliegen, war es zu Beginn der Analysen fraglich, ob die ISSR-PCR überhaupt geeignet ist, bei einer hochvariablen Tagfalterart auf Populationsebene auswertbare Ergebnisse zu liefern.

Die Eignung der Methode kann nunmehr bestätigt werden.

4.2 Genetische Marker

Die große Zahl an Markern, die in dieser Studie erzielt wurde, zeigt die grundsätzliche Fähigkeit der ISSR-PCR, für jedes Individuum einen genetischen Fingerabdruck produzieren zu können. Dabei ist die Wahl eines geeigneten Primers von entscheidender Bedeutung. So gibt es Primer, die zwar klare, aber auch nur wenige Banden liefern, so dass je nach Stichprobenzahl die Anzahl der Banden für eine Unterscheidung der Individuen nicht ausreicht. Geht man auf Populations- oder Artniveau, so sind sichere Ergebnisse nur zu erwarten, wenn man eine höhere Anzahl an Markern mit Hilfe mehrerer Primer gewinnen kann. In der hier vorliegenden Gesamtanalyse wurden 410 Marker, die mit acht Primern amplifiziert worden sind, allein für das Taxon *M. athalia* untersucht. Daneben liegen noch die Ergebnisse drei weiterer Primer vor, auf deren Darstellung in dieser Arbeit verzichtet worden ist. Diese Primer produzierten so viele individuell unterschiedliche Marker, dass eine taxonspezifische Auswertung wenig Sinn machte. Insofern ist

bei einer ISSR-Analyse nicht die Anzahl der eingesetzten Primer entscheidend, sondern die Ausbeute an polymorphen und informativen ISSR-Markern.

Es wurde ein hohes Maß an Polymorphismus bei den untersuchten Taxa festgestellt. Bezogen auf acht Primer schwankten die Polymorphismuswerte der *M. athalia*-Populationen zwischen 74 und 98 %, bei einem Durchschnittswert von 92 % (n = 101). Interessanterweise lagen die Werte für die Vergleichsarten ähnlich, obwohl weit weniger Individuen untersucht wurden: *M. cinxia*: 92 %, (n = 4), *M. diamina* 93 % (n = 12), *B. euphrosyne* 91 % (n = 5) und *I. lathonia* 82 % (n = 5). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Studien, in denen ISSR-Marker erfolgreich eingesetzt wurden, um Taxa auf Art- oder niedrigerem Niveau zu trennen (Wolfe et al. 1998; Culley & Wolfe 2001, Wolfe & Randle, 2001). Zum Beispiel benutzten Wolfe et al. (1998) ISSR-Marker, um Hybridisierungsmuster der Pflanzengattung *Penstemon* aufzuzeigen, wobei sie Polymorphismusraten von 72 - 95 % bei sieben untersuchten Taxa feststellten. Wolfe und Randle (2001) untersuchten die Beziehungen und taxonomischen Grenzen bei vier Taxa der Pflanzengattung *Hyobanche* und fanden Polymorphismuswerte von 64 - 96 %. 100 % wurden von Culley und Wolfe 2001 bei Studien zu Unterscheidung zweier *Viola pubescens* Varietäten festgehalten. Die Untersuchung von dreizehn Seidenspinner-Linien (*Bombyx mori*) mit sechs Primern erbrachte 77 % an polymorphen Banden (Reddy et al. 1999). Hundsdörfer und Wink (2005) fanden bei der Studie mit dem Primer (GACA)_n bei *Acentria ephemerella* (Lep., Pyralidae) 75 %, *Hyles euphorbiae* (Lep., Sphingidae) 80 % sowie bei *Pieris napi* (Lep., Pieridae) 100 % polymorphe Loci.

Der hohe Polymorphismus erschwert natürlich die Interpretation der Ergebnisse. Es ist allerdings festzustellen, dass es je nach Taxon oder auch Population gewisse Häufungen von Markern gibt. Als ein Beispiel für einen artspezifischen Marker in dieser Untersuchung kann bei *M. cinxia* das vom UBC-Primer 880 amplifizierte Fragment „1790 bp“ dienen. Dennoch bleibt es fraglich, ob dieses Fragment auch bei einer hohen Stichprobenzahl, wie sie für *M. athalia* vorliegt, konstant produziert werden kann oder ob letztlich auch hier keine Monomorphie vorliegt.

Ein Beispiel für ein konservatives Fragment ist das ebenfalls von UBC-880 produzierte, 2300 bp lange DNA-Stück. Es findet sich artübergreifend bei *M. aurelia*, *M. cinxia* und *B. euphrosyne* zu 100 %, bei *M. athalia* zu 92,7 %, bei *M. diamina* zu 83,3 %. Nur bei *I. lathonia* konnte es nicht nachgewiesen werden.

Letztlich können Schlüsse nur gezogen werden, wenn alle Marker in Ihrer Gesamtheit betrachtet

werden („fingerprint“). So gibt es – wie gerade gezeigt – Marker, die zumindest schwerpunktmäßig bei einer Art oder auch bei einer Population vorkommen. Umgekehrt kann auch das Fehlen eines Markers diagnostisch wertvoll sein, wie das gerade beim Beispiel des Fragments 2300 bp des Primers 880 bei *I. lathonia* gezeigt wurde.

Da die ISSR-PCR ein recht neues Verfahren ist, fehlt es bisher an Standardisierungen bezüglich der Auswertung mit Hilfe verschiedener Indizes (Hundsdoerfer & Wink 2005). Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Dice- und des Jaccard-Index praktisch gleichwertige Ergebnisse geliefert hat. Des Weiteren sorgte die Anwendung des Raup-Crick-Index durch das integrierte Bootstrappingverfahren für eine zusätzliche statistische Absicherung. Durch die gute Zugänglichkeit anhand der Software *PAST 1.4* sollte dieser Index breitere Anwendung finden.

4.3 Differenzierung und Beziehungen zwischen *Melitaea athalia*-Populationen

Die AMOVA-Analysen sind ganz besonders geeignet, die genetische Differenzierung von Populationen aufzulösen. Der höchste Anteil an genetischer Variation findet sich bei *M. athalia* innerhalb der Populationen. Fasst man die 14 Fundorte zu 8 Populationen zusammen, so beträgt dieser Anteil 85 % und erhöht sich auf 94 %, wenn man diese 8 Populationen gemäß der Clusteranalyse auf Basis der F_{st} -Werte zu 3 Großraumpopulationen zusammenfasst. Grundsätzlich bedeutet ein solches Muster, dass von einer hohen Rate an Genfluss auszugehen ist. AMOVA-Untersuchungen an 2 Unterarten von *Oleria onega* (Lep., Nymphalidae, Ithomiinae) und ihrer vermuteten Hybride aus Nord-Ost-Peru, die mit der verwandten RAPD-Methode durchgeführt wurden, ergaben auf Basis von 92 Markern Werte von 67,2 % innerhalb 7 Populationen, 19,6 % zwischen den Populationen innerhalb der 2 Unterarten sowie 13,2 % zwischen den Unterarten (Galusser et al. 2004). Führt man einen solchen Test bei *M. athalia* mit der bisherigen taxonomischen Nord/Süd-Unterteilung durch, so lassen sich nur 3,2 % der genetischen Unterschiede auf die beiden Taxa *athalia* und *celadussa* zurückführen. 83,9 % entfallen auf genetische Unterschiede innerhalb der Populationen sowie 12,9 % auf Populationsunterschiede innerhalb der beiden Taxa (s. Tabelle 4.1).

Tab. 4.1: AMOVA-Analyse auf Basis der klassischen Nord/Süd-Unterscheidung (resp. *M. athalia/celadussa*)

Variationsquelle	d.f.	SSD	Varianzkomponenten	Varianz (%)	P-Werte	F-Indizes
Zwischen beiden Taxa	1	171,54	1,16	3,17	< 0,001	
Zwischen den Populationen innerhalb der beiden Taxa	6	498,97	4,74	12,92	< 0,001	F_{sc} :0,1334 F_{st} :0,1609 F_{ct} :0,0317
Innerhalb der Populationen	93	2859,67	30,75	83,91	< 0,001	

Anmerkungen: Signifikanztest: 1023 Permutationen. Die F-Statistiken werden durch drei Fixationsindizes wiedergegeben: F_{ct} = Verhältnis der Differenzierung zwischen beiden Taxa, F_{sc} = Differenzierung zwischen den Populationen innerhalb der beiden Taxa, F_{st} = Gesamtdifferenzierung der Populationen. Weitere Erläuterungen s. Tabelle 3.20.

Eine klare Trennung zwischen Nord / Süd bzw. *M. athalia* / *celadussa* kann auf Grundlage dieser Analyse nicht festgestellt werden. Dennoch sind die 8 Populationen strukturiert: Die Gegenüberstellung einzelner, insbesondere geographisch weiter entfernter Populationen zeigt schon ein differenzierteres Bild: Immerhin liegt der Anteil an genetischer Variation zwischen der Ostpolnischen Population und den 3 „Süd“-Populationen (Südfrankreich, Südtirol, Wallis) zwischen 14,7 und 21,1 %. Zwei Ergebnisse sind somit besonders hervorzuheben:

1. Die Südfranzösische Population hat eine hohe genetische Beziehung zur „Nominat-*Athalia*“, die hier durch die „Nord“-Gruppe (Fichtelberg, Brandenburg, Vorarlberg und Finnland) vertreten wird.
2. Die Polnische Population (genauer: Ostpolnische Population) zeigt größere genetische Abstände zur „Nord“-Gruppe und wird möglicherweise von den noch weiter östlich vorkommenden Populationen weit mehr beeinflusst.

Der auf Grundlage der 8 Populationen ermittelte F_{st} -Wert beträgt 0,150. Damit ist er mit Werten anderer Studien bei Lepidopteren vergleichbar, bei denen Mikrosatelliten verwendet wurden, wie bei *Melitaea cinxia* $F_{st} = 0,20$ (Palo et al. 1995), *Polyommatus bellargus* $F_{st} = 0,127$ (Harper et al. 2003) und den Ungarischen Populationen von *Parnassius mnemosyne* $F_{st} = 0,070$ (Megléczy et al. 1998). Die bei anderen Arten durch Allozymelektrophorese gewonnenen Daten bewegen sich ebenfalls in dieser Größenordnung: Beispiele hierfür sind die Schreckenfaller *Euphydryas editha* $F_{st} = 0,120$, *Euphydryas chalcedona* $F_{st} = 0,090$ (McKechnie et al. 1975) und *Melitaea didyma* $F_{st} = 0,10$ (Johannsen et al. 1996), die Polnischen Populationen des Bläulings *Maculinea nausithaus* $F_{st} = 0,153$ (Figurny-Puchalska et al. 2000) oder der Augenfalter *Erebia medusa* $F_{st} = 0,149$ (Schmitt 1999).

Eine weitere Bestätigung für den genetischen Zusammenhalt der Populationen liefern auch die UPGMA-Clusteranalysen der Indizes nach Dice, Jaccard und Raup-Crick. Trotz geringer Unterschiede werden die einzelnen Falter meist klar nach Populationen getrennt. Das trifft insbesondere auf die Polnische, Walliser und Südtiroler Populationen zu, während die Südfranzösischen Falter auf vier Zweige verteilt sind, was im Gegensatz zu der geltenden Auffassung als Hinweis gewertet werden muss, dass es sich nicht um eine separierte Subspezies handelt, sondern um eine Population, deren genetische Inhomogenität nur mit dem Einfluss benachbarter, nördlicher Populationen erklärt werden kann. Zusätzlich unterstützt wird diese These durch die gleichmäßig hohen Nm -Werte für die Südfranzösische Population. Dies lässt vermuten, dass diese Population vergleichsweise wenig isoliert ist und offenbar mit allen benachbarten Populationen in einem gewissen Genaustausch steht. Da die Tiere nicht über Hunderte von Kilometern fliegen und zudem auch keine Wanderfalter sind, ist dies nur mit dem Vorhandensein einer Populationskette erklärbar.

Ein weiterer Bereich wird durch die Ostdeutschen Populationen geprägt, allerdings unterbrochen von Vorarlberger und Finnischen Tieren. Aistleitner (1999) hatte aufgrund morphologischer Untersuchungen den Verdacht geäußert, dass es sich bei den Vorarlberger Populationen um einen „Diffusionsbereich beider Phäna“ handelt (gemeint sind die Taxa „*athalia*“ und „*celadussa*“). „Die Grenze zwischen der mitteleuropäischen Nominat-Unterart und der südwesteuropäischen ssp. *celadussa* FRUHSTORFER, 1910, die sich genitaliter deutlich unterscheiden, verläuft, regional betrachtet, durch Liechtenstein und VBG“ (VBG=Vorarlberg) (Aistleitner & Aistleitner 1996). Die vorliegenden genetischen Untersuchungen rücken jedoch diese Populationen sehr nah an die Nordostdeutschen Populationen heran. Offenbar gibt es zwischen diesen Populationen nahezu lückenlose Verbindungen: *M. athalia* ist auch heute noch in Österreich und im Süden und Südosten Bayerns ebenso weit verbreitet wie in Tschechien und der Slowakei (Belin 1999). Eine Verbindung von Vorarlberg über die Gebirgszüge Böhmerwald, Oberpfälzer Wald, Fichtelgebirge zum Erzgebirge ist geographisch und ökologisch naheliegend und kann als sicher gelten. Der große geographische Abstand der Finnischen Population zu den anderen Populationen würde ad hoc vermuten lassen, dass sich dementsprechend auch größere genetische Veränderungen manifestiert haben. Dies lässt sich – zumindest mit der vorliegenden kleinen Stichprobe – nicht bestätigen. Trotz leichter phänetischer Unterschiede (die Tiere sind auf der Hinterflügelunterseite auffallend intensiv und kontrastreich gefärbt), gehören diese Falter zweifellos zum nördlichen

M. athalia-Komplex. Dagegen scheint sich die Ostpolnische Population, die aus dem Nationalpark Białowieża, einem der letzten ursprünglichen Wälder Europas, stammt, entweder genetisch differenziert zu haben oder unterliegt den Einflüssen sibirischer Faunenelemente deutlich mehr als die von ihr aus gesehenen westlichen Populationen. Die Walliser Tiere clustern geschlossen, sie sind genetisch einheitlicher und somit isolierter als die Südfranzösischen Falter.

Die Hauptkoordinatenanalyse liefert eine zusätzliche Möglichkeit, die Zusammenhänge zwischen Individuen und Populationen sichtbar zu machen: Während die Vergleichsarten *I. lathonia*, *B. euphrosyne*, *M. cinxia* und *M. diamina* klare und engbegrenzte Bereiche einnehmen, obwohl zwischen Populationen nicht differenziert wurde, überlappen sich die *M. athalia*-Populationen oder sind kettenartig miteinander verknüpft. Die drei verwendeten Indizes führen nicht zu völlig identischen Ergebnissen, dennoch werden bestimmte Schlussfolgerungen bestätigt. Dazu gehören die geringe genetische Diversität zwischen den Populationen aus Vorarlberg, Brandenburg und vom Fichtelberg und die größere Affinität der oftmals separat erscheinenden Walliser zur Südfranzösisch-Ligurischen Population. Die letztere stellt genetisch betrachtet ein Bindeglied zwischen den Walliser und Ostdeutschen Populationen dar. Trotz des größeren Abstandes zu den Walliser Faltern scheinen auch die Tiere aus Südtirol zwischen den beiden Lagern zu stehen. Die bemerkenswert separierte Rolle der Polnischen Population in der Untersuchung belegt insbesondere die Analyse auf Basis des Raup-Crick-Indexes bezüglich der 2. und 3. Eigenwert-Koordinaten. Ein Genaustausch mit den Ostdeutschen Populationen scheint in eher geringem Umfang stattzufinden.

Die Ergebnisse der „Maximum Parsimony“-Analyse sollen im Gegensatz zu den bisher besprochenen Verfahren phylogenetische Zusammenhänge widerspiegeln. Die Polarisierung bei der Untersuchung der verschiedenen *M. athalia* Populationen erfolgte durch die Außengruppenaddition (*M. diamina*). Der „strict consensus“-Baum zeigte eine ausgeprägte Polytomie, so dass hieraus kein Ablauf der Evolution zwischen den Populationen abgeleitet werden konnte. Lediglich die Monophylie einzelner (Teil-)Gruppen konnte nachgewiesen werden. Insbesondere die Walliser und die Polnische Population – wenn man von einem finnischen Individuum absieht – fallen dabei auf. Betrachtet man den „50 %-majority-rule“ Baum, so leitet sich die „Gruppe 1“, bestehend aus den Populationen des Fichtelbergs, Brandenburgs und Vorarlbergs, letztlich von den Polnischen Populationen („Gruppe 3“) her. Die „Gruppe 1“ kann als „*athalia* s. str.“ in taxonomischen Sinne angesehen werden. Die Verbindung dieser drei Populationen wird

somit mehrfach unterstützt: Sie zeigen bei der AMOVA untereinander die geringsten F_{st} -Werte. Die Hauptkoordinatenanalysen auf Basis des Dice- und des Jaccard-Index verdeutlichen dies jeweils mit den Eigenwerten 1 und 2 (Abb. 3.24 und 3.26 links).

Die „Gruppe 2a“ wird von allen Stichproben Südtirols, dem Großteil der Finnischen Tiere und einigen Faltern aus Südfrankreich und Ligurien gebildet. Südtirol liegt im vermuteten „Hybridgürtel“ von „*athalia*“ und „*celadussa*“. Die Position der Finnischen Population in der „Gruppe 2a“ bleibt unklar. Der Datensatz ist zu klein ($n = 4$), um eine Verbindung zwischen den Südtiroler oder Südfranzösisch-Ligurischen Populationen herstellen zu können. Die „Gruppe 2a“ steht zumindest tendenziell der „Gruppe 1“ nahe, welche die Stichproben auf sich vereint, die der Nominatform (*M. athalia athalia*) zuzurechnen sind. Die „Gruppe 2b“, die sich aus den Walliser und einem Großteil der Südfranzösischen Populationen zusammensetzt und „Gruppe 2c“, die von zwei Südfranzösischen Tieren gebildet wird, geben eine Zusammensetzung wieder, die der klassischen „*celadussa*“-Zuordnung entspricht. Der Zusammenhang zwischen einem Teil der Südfranzösischen Stichprobe und der Walliser Population wird nicht nur durch die MP-Analyse, sondern ebenso durch die UPGMA-Clusteranalyse auf Basis des Dice- und Jaccard-Index gestützt. Gleiches gilt für die Aufteilung der Südfranzösischen Population auf mehrere Zweige. Die Südfranzösisch-Ligurischen Tiere zeigen auch in den anderen Analysen ein uneinheitliches Bild, so dass die bereits formulierte Schlussfolgerung, dass diese Populationen genetisch von nördlichen Populationen beeinflusst werden, auch hier ihre Bestätigung findet.

Durch diese Analysen wird zweierlei sichtbar: Zum einen gibt es einen Genfluß zwischen den Populationen, zum anderen ist belegt, dass geographischer Abstand eine bedeutende Barriere für Genfluss darstellt. Von daher zeigt *M. athalia* ein differenziertes Bild: Zwischen einem Teil der Populationen besteht ein recht hoher Genfluss, von einer Isolation selbst eines so exponierten Standortes wie dem Fichtelberg kann nicht die Rede sein. Obwohl die Walliser Populationen ebenfalls nicht isoliert sein dürften (Rhonetal!), scheinen die geographischen Gegebenheiten durch die zahlreichen über 3000 - 4000m hohen Berge doch für eine gewisse Abgeschiedenheit gesorgt zu haben. Eine Durchmischung mit der „taxonomischen Stammform“ (= *M. athalia athalia*), in dieser Untersuchung vertreten durch die „Gruppe 1“, hat hier bislang kaum stattgefunden. Die Südfranzösischen Populationen galten spätestens seit Higgins (1955) als „reinrassige“ Vertreter der südlichen Unterart (Locus typicus!), aber hier scheint die „taxonomische Stammform“ hinter dem Alpenbogen über die Küstenregion Zugang zu den dortigen

Populationen gefunden zu haben und die Durchmischung der Gene stärker fortgeschritten zu sein, als allgemein angenommen wurde. Diese Auffassung wird auch durch folgende eigene Untersuchungen (Achtelik, unveröffentlicht) bestätigt:

- Bei Genitaluntersuchungen von Individuen aus Südfrankreich wurden immer wieder rudimentäre Unci festgestellt.
- Bei Allozymuntersuchungen konnte die Vermutung von Pelz (1995), dass es am Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Locus (G6PDH) Markerallele für die Taxa „*athalia*“ und / oder „*celadussa*“ geben könnte, trotz intensiver Suche nicht bestätigt werden. Weder an diesem Locus noch an anderen untersuchten Loci (n = 17) konnten überhaupt diagnostisch wertvolle Allele entdeckt werden. Dabei wurden eigens - wie bei Pelz - für das Taxon „*celadussa*“ u. a. Falter aus St. Martin Vésubié, Alpes Maritimes, untersucht, um zu vermeiden, dass es durch die Verwendung von Untersuchungsmaterial anderer Herkunft zufällig zu anderen Ergebnissen kommt.
- Hybridisierungsversuche verliefen erfolgreich: So gelangen erfolgreiche Paarungen in Flugkäfigen bei Langtagbedingungen (> 18 Std. Licht, ca. 28 °C, ausreichende Fütterung) zwischen Südfranzösischen und Finnischen, Westschweizer sowie Vorarlberger Faltern. Auch die anschließenden Zuchten verliefen ohne Auffälligkeiten. Beuret (1933) ist bislang der einzige, der Zuchtversuche zwischen den beiden Taxa „*athalia*“ (♀: Deutschland, Baden, Säcking) und „*celadussa*“ (♂: Schweiz, Tessin, Val Canaria) dokumentiert hat, wobei diese misslangen. Das gab der Meinung Auftrieb, diese beiden Taxa seien getrennte Arten. Er erreichte zwar eine Paarung und die nachfolgende Eiablage, aber es schlüpfen keine Räumchen, obwohl eine embryonale Entwicklung ausgelöst worden war. Beuret hielt eine „Bastardkrankheit“ für denkbar, obwohl er gleichzeitig von ähnlichen Problemen bei Zuchten innerhalb der gleichen Populationen berichtet. Aus eigener Erfahrung weiß ich, dass die Gelege des *M. athalia / celadussa*-Komplexes sehr empfindlich auf mangelnde Luftzirkulation oder zuviel Feuchtigkeit reagieren, so dass die mißlungene Zucht Beuret's vermutlich eher auf solche Faktoren zurückzuführen sein dürfte als auf eine „Bastardkrankheit“.

Es gibt somit genügend Hinweise, dass die ursprüngliche Gesamtpopulation von *M. athalia* in der erdgeschichtlichen Vergangenheit geographisch in mindestens 2 Populationen gespalten

worden ist. Diese Populationen, eine nördlich und eine südlich der Alpenkette, entwickelten sich getrennt weiter, wobei sich morphologische Unterschiede in allen Entwicklungsstadien (Beuret 1933, eigene Beobachtungen) manifestierten. Viele Schmetterlinge weisen im Süden ihres Verbreitungsgebietes z. B. eine größere Flügelspannweite auf und zeigen eine hellere Flügel-färbung. Das trifft auch auf die südlich der Alpen verbreitete Form von *M. athalia* zu. Allerdings ist es bei dieser Form, anders als bei vergleichbaren Arten, noch zu weiteren Veränderungen gekommen, als deren auffälligste das Fehlen der Uncusspitzen¹ gilt. Dabei ist davon auszugehen, dass es sich um eine Reduktion handelt, da Reduktionen keine bestimmte oder komplexe Serie von Mutationen benötigen und daher eine höhere Wahrscheinlichkeit haben als die Neuentstehung eines Merkmals. Durch die unterschiedlichen Untersuchungen kann belegt werden, dass trotz der zeitweisen Trennung der Verbreitungsgebiete und der nachgewiesenen genetischen Differenzierung keine Speziation stattgefunden hat. Es hat sich somit bei der Betrachtung der beiden in der Vergangenheit räumlich und reproduktiv getrennten Populationen nördlich und südlich der Alpen vielmehr um eine potentielle Fortpflanzungsgemeinschaft gehandelt, die nach sich nach Wegfall der geographischen Barrieren (Rückzug der Gletscher) wieder zu einer funktionellen Fortpflanzungsgemeinschaft zurückentwickelt hat.

4.4 Die Gefährdungssituation von *Melitaea athalia*

Die aktuelle Gefährdungssituation für *M. athalia* in Europa muss differenziert betrachtet werden. Einerseits gibt es individuenstarke Populationen besonders im Alpenraum, die sicher nicht als gefährdet anzusehen sind. Gleiches gilt sicherlich für die bereits skizzierte Verbindung von den nördlichen Alpen über die mittleren Höhenlagen entlang der Tschechischen und Slowakischen Grenzen bis in den Brandenburger Raum. Problematisch wird es, wenn durch den Eingriff des Menschen Lebensräume großräumig zerstört werden und die Populationen zunehmend isoliert werden. Dies ist bereits in den Bundesländern Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen (Lobenstein 2003) und Schleswig-Holstein (Kolligs 2003) der Fall. Hier gibt es allenfalls sehr wenige und kleine Populationen. Insgesamt geht man in Deutschland von 25-50 % Bestandseinbußen aus. Auch im europäischen Ausland beklagt man erhebliche Rückgänge: Belgien, Luxemburg und Niederlande (> 50 % Bestandsverlust in 25 Jahren), Dänemark (25 % - 50 %), Österreich,

¹ Der Uncus ist eine chitinöse Struktur des männlichen Genitalorgans

Frankreich, Lettland, Moldawien, Slowakei, Schweden (15-25 %) (Asher et al. 2001). Besonders dramatisch ist die Situation in England, wo *M. athalia* inzwischen zu den seltensten Schmetterlingen zählt und nur durch den konzertierten Einsatz von Naturschützern noch an wenigen Stellen überlebt hat. Dass der „Wachtelweizen-Scheckenfalter“ ökologisch so unter Druck geraten ist, hat auch mit seiner Lebensweise zu tun: Die Art ist sehr standorttreu und bildet geschlossene Kolonien um die Futterpflanzenhabitate aus, die manchmal nicht mehr als 0,5 ha groß sind. Durch Markierungsexperimente konnte man feststellen, dass sich die Tiere meist in einem Umkreis von 100 m bewegen, wobei vereinzelt auch Wiederfunde im Abstand von 2 km verzeichnet werden konnten. Da viele der Habitate kurzlebig sind, ist die Art gezwungen, auch neue geeignete Lebensräume zu finden. Dabei sind die Fähigkeiten, neue Kolonien zu begründen, trotz des grundsätzlich vorhandenen Nomadentums, sehr eingeschränkt. Studien in Südostengland haben gezeigt, dass selbst geeignete Habitate, die nur 600 m weit von einer Population entfernt liegen, nur sehr zögernd, wenn überhaupt, besiedelt werden (Barnett & Warren, 1995; Brereton et al. 1998, Feber et al. 2000, Warren 1987, 1991, Warren et al. 1984). Angesichts der (noch) vorhandenen hohen genetischen Variabilität hat *M. athalia* sicherlich gute Chancen, nicht ausgerottet zu werden, solange nur genügend viele und nicht zerstreute Biotope erhalten bleiben.

4.5 Taxonomische Konsequenzen

Taxonomischen Konsequenzen sollten erst nach dem Abschluss weiterer Untersuchungen (z. B. Morphologie, Allozymelektrophorese, DNA-Sequenzierung) gezogen werden. Unstrittig ist die Zuordnung des Artnamens „*athalia*“ zu den um Paris fliegenden Tieren. Diese Populationen sind eindeutig den uncusspitzentragenden Faltern West-, Mittel- und Nordeuropas zuzuordnen. Die uncusspitzlose Form wurde von Reverdin 1920 als eigene Art *M. pseudathalia* beschrieben. Zeitweise wurde dieser Name durch die Bezeichnung „*helvetica*“ Rühl 1888 ersetzt, dem manche Autoren Priorität einräumten. Higgins beendete die bereits vor mehr als 60 Jahren diskutierte Frage, wie die uncusspitzlose Form von „*athalia*“ heißen müsste, indem er als Locus typicus für diese Form den Ort Tende, Alpes Maritimes, auswählte. Fruhstorfer (1910) hatte der Population dieses Ortes den Namen „*celadussa*“ gegeben. Diese Population war für Higgins die älteste benannte reine uncusspitzlose Subspezies von *M. athalia*: „There can be no doubt that this is the oldest name that applies unquestionably to the sub-species, of which the holotype

exists and the typical locality is definitely known and therefore it must take precedence over *pseudathalia* Rev., 1920“ (Higgins 1955). Die bisherigen Ergebnisse zeigen jedoch, dass es sich bei dieser Südfranzösischen Population, wie bei allen weiteren untersuchten Südfranzösischen oder benachbarten Ligurischen Populationen, vermutlich um Hybride zwischen der Stammart „*athalia*“ und einer südlich der Alpen verbreiteten Form handelt. Insofern scheint mir die Zuordnung des Namens „*celadussa*“ für die Bezeichnung einer Unterart, die das möglichst „reinrassige“, uncusspitzenlose südliche Taxon von *M. athalia* repräsentieren soll, ungeeignet zu sein. Rezbanyai-Reser (1987) vertritt die Auffassung, dass „*athalia*“ und „*celadussa*“ nicht als „gewöhnliche“ Unterarten betrachtet werden können, „da innerhalb beider Taxa deutliche, ökologisch-geographisch bedingte morphologische Aufspaltungen bemerkbar sind“. Demnach vertritt „*celadussa*“ „eben eine weitere Stufe der Artentwicklung, ein Taxon, das zu einer Unterartgruppe der Art *athalia* gehört, wie dies in der Neufassung der Nomenklaturregeln (1985) sogar als Beispiel aufgeführt wird (Art. 6b, Examples, p. 11). Der Name dieser Unterartgruppe (Supersubspezies?) soll aus Prioritätsgründen „*nevadensis* OBERTHÜR 1905“ heißen“.

Die Frage, ob die Bildung von „Unterartgruppen“ sinnvoll ist, soll hier nicht diskutiert werden. Richtig ist allerdings, dass das Taxon „*nevadensis*“ auf Grund seiner isolierten Lage in der spanischen Sierra Nevada (s. Abb. 2.2) eine vermutlich reine uncusspitzenlose Form von „*athalia*“ darstellt und daher als Ersatz für die Bezeichnung „*celadussa*“ grundsätzlich geeignet ist. Auch bei der Genitaluntersuchung eigenen Sammlungsmaterials konnte ich bei Tieren aus der Sierra Nevada keine Übergangsformen feststellen.

5. Zusammenfassung

Bei der vorliegenden Untersuchung wird erstmalig mit Hilfe der ISSR-PCR eine großräumige Populationsanalyse bei der zunehmend in ihrem Bestand bedrohten Tagfalterart *Melitaea athalia* vorgenommen. Dabei erwiesen sich die hohe Reproduzierbarkeit, überschaubare Kosten sowie ein vergleichsweise geringerer Zeitaufwand als Vorteile der ISSR-PCR gegenüber anderen Methoden wie RAPD, AFLP oder Mikrosatelliten-PCR (SSR). Die Methode ist geeignet, Zusammenhänge zwischen verschiedenen Populationen von *M. athalia* nachzuweisen. Darüber hinaus konnten mit Hilfe der gewonnenen Daten fünf verwandte Arten aus der Familie der Nymphalidae, namentlich die Scheckenfalter *Melitaea diamina*, *Melitaea cinxia* und *Melitaea aurelia* sowie die Permuttfalter *Boloria euphrosyne* und *Issoria lathonia* untereinander sowie gegenüber *M. athalia* differenziert werden. Aufgrund der hohen Polymorphismusrate war es notwendig, geeignete Primer zu suchen, die in der Lage waren, eine hohe Anzahl von auswertbaren Markern zu produzieren. Hierzu wurden 90 Primer getestet und davon 14 für weitere Analysen ausgewählt. 8 Primer waren in unterschiedlicher Art in der Lage, Arten und Populationen zu trennen. Ein populationspezifischer Marker konnte weder für die Nominatform *M. athalia athalia* noch für das Taxon *M. athalia celadussa* - vermutlich aufgrund des vorhandenen Genflusses - gefunden werden. Die Kombination geeigneter Marker ermöglichte die Unterscheidung von Arten, Populationen und Individuen in Form eines genetischen Fingerabdrucks. Die Anwendung mehrerer Diversitätsindizes zeigte, dass die Verwendung der bei dominanten Markern häufiger eingesetzten Dice- und Jaccardindizes gleichwertig waren. Der zusätzliche Vergleich mit dem Raup-Crick-Index, der mit einem integrierten Bootstrappingverfahren arbeitet, wird aus Gründen der statistischen Absicherung für zukünftige Untersuchungen empfohlen. Es wurden mehrere analytische Methoden angewandt, um zu überprüfen, ob Ergebnisse unabhängig voneinander durch verschiedene Untersuchungsmethoden bestätigt werden: Auf Basis des Dice-, Jaccard- und Raup-Crick-Index wurden UPGMA-Cluster- sowie Hauptkoordinatenanalysen (PCOs) auf Art, Unterart- und Populationsebene durchgeführt. Die genetische Struktur der *M. athalia*-Populationen wurde mit Hilfe einer AMOVA untersucht, die errechneten F_{st} -Werte wurden einer weiteren UPGMA-Clusteranalyse unterzogen und die Nm -Werte bestimmt. Mit Hilfe des „Maximum Parsimony“-Verfahrens wurden Kladogramme konstruiert, die phylogenetische Zusammenhänge offen legten. Die ISSR-Marker wiesen *M. aurelia*

auf Basis des vorliegenden Datensatzes als Schwestergruppe von *M. athalia* aus. Gleichzeitig konnte die enge phylogenetische Beziehung zwischen *M. diamina* und *M. cinxia* belegt werden.

Folgende weitere Feststellungen lassen sich in Bezug auf die eingangs formulierten Fragen (s.1.4) treffen:

- Es gibt bei *M. athalia* homogene Populationen: Beispiele sind die Polnische Population aus Białowieża sowie die Walliser Population.
- Aufgrund fehlender geographischer Barrieren gibt es Populationen, die so eng miteinander verwandt sind, dass man von einem nahezu einheitlichen Genpool ausgehen kann. Beispiele sind die Populationen aus Vorarlberg, vom Fichtelberg (Sachsen) und aus Brandenburg.
- Klare Trennungen, wie sie zu den Vergleichsarten festgestellt werden konnten, ließen sich zwischen den Populationen von *M. athalia* nicht nachweisen. Bei den untersuchten Populationen ist von einem Genfluß in unterschiedlichem Maße auszugehen.
- Die molekularen Marker der ISSR-Analyse stützen grundsätzlich die Unterteilung in die Taxa *M. athalia athalia* und *M. athalia celadussa*. Gleichzeitig werden durch sie auch Populationen entdeckt, die weder dem einen, noch dem anderen Taxon eindeutig zuzuordnen sind. Das betrifft in der vorliegenden Untersuchung die Populationen aus Südfrankreich / Ligurien und aus Südtirol.
- Der Typenfundort des Taxons „*celadussa*“ ist Tende in Südfrankreich und somit einer Zone zuzuordnen, die sowohl von südlichen als auch von nördlichen Populationen beeinflusst wird. Konsequenterweise sollte der Name „*celadussa*“ durch den Namen eines möglichst „reinrassigen“ uncuspitzenlosen Taxons ersetzt werden. Hierfür bietet sich das isolierte südspanische Taxon „*nevadensis* Oberthür 1905“ an.

In den letzten 50 Jahren haben die teilweise dramatisch verschlechterten Lebensbedingungen für Schmetterlinge europaweit zum Aussterben vieler Populationen geführt. Die vorliegende hohe genetische Variabilität lässt jedoch darauf schließen, dass *Melitaea athalia* grundsätzlich über genügend genetische Anpassungsfähigkeit verfügt, um geeignete Biotope neu besiedeln zu können, sofern diese sich in der Nähe rezenter Populationen befinden. Eine Verinselung ist jedoch eine große Gefahr und wird nach den bisherigen Erfahrungen schnell zum Verschwinden dieses schönen Schmetterlings führen.

6. Literaturverzeichnis

Achtelik G. (1999): Vier neue Arten aus der „*Melitaea sultanensis*-Gruppe“ (Staudinger, 1886) (Lepidoptera, Nymphalidae). *Atalanta* **30**: 63-86, Farbtafeln I-V.

Ackery P.R. (1984): Systematics and faunistic studies on butterflies. In: Vane-Wright R. I., Ackery P. R. (eds.): *The Biology of Butterflies* Princeton University Press Princeton, New Jersey: 9-21.

Aistleitner E. (1999): Schmetterlinge Vorarlbergs 1. Vorarlberger Naturschau, Dornbirn: 1-377.

Aistleitner E., Aistleitner U. (1996): Die Tagfalter des Fürstentums Liechtenstein (Lepidoptera: Papilionoidea und Hesperioidea). *Naturkundliche Forschung im Fürstentum Liechtenstein, Vaduz*: **16**: 1-159.

Amsellem L., Risterucci A. M., Benrey B. (2003): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Lobesia lotrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). *Molecular Ecology* **3**: 117-119.

Anthony N., Gelembiuk G., Raterman G., Nice C., French-Constant R. (2001): Isolation and characterization of microsatellite markers from the endangered Karner blue butterfly *Lycaeides melissa samuelis* (Lepidoptera). *Hereditas* **134**: 271-273.

Asher J., Warren M., Fox R., Harding P., Jeffcoate G., Jeffcoate S. (2001): *The Millennium Atlas of Butterflies in Britain and Ireland*: Oxford University Press, Oxford : 1-433.

Barnett L.K., Warren M. S. (1995): Species action plan: Heath Fritillary *Melicta athalia*. Butterfly Conservation, Wareham.

Belin V. (1999): Tagfalter, Widderchen und Glasflügler der Tschechischen und Slowakischen Republik. Nakladatelstvi Kabourek, Zlin: 1-95.

-
- Beuret H. (1931): Zur Kenntnis der Variabilität von *Melitaea athalia* Rott. und *pseudathalia* Rev. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* **15**: 78-97.
- Beuret H. (1933): Studien über *Melitaea athalia* Rott. und *helvetica* Rühl (*pseudathalia* Rev.) (Lep.). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* **15**: 424-455.
- Bogdanowicz S.M., Mastro V.C., Prasher D.C., Harrison R.G. (1997): Microsatellite DNA variation among Asian and North American gypsy moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Annals of the Entomological Society of America* **90**: 768-775.
- Boggs C.L. Watt W.B., Ehrlich P.R. (2003): *Butterflies: Ecology and Evolution taking flight*. University of Chicago Press; Chicago – London.
- Bonnet E., Van de Peer Y. (2002): Zt: A software tool for simple and partial Mantel tests. *Journal of Statistical Software* **7**: 1-12.
- Bourgogne J. (1953): *Melitaea athalia athalia* Rott. et *M. athalia helvetica* Rühl (*pseudathalia* Rev.) en France Étude Biogéographique. *Annales de la Société entomologique de France* **122**: 131-176.
- Brereton T.M., Roberts E., Warren M.S. (1998): Action for the Heath Fritillary: status, monitoring and conservation progress 1996 and 1997. Butterfly Conservation (Confidential report), Wareham
- Bornet B., Branchard M. (2001): Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**: 209-215.
- Britten H.B., Brussard P.F., Murphy D.D. (1995): Isozyme data and the taxonomy of checkerspot butterflies (*Euphydryas*). *Journal of Research on the Lepidoptera* **32**: 124-134.

Brussard P.F., Ehrlich, P.R., Murphy D.D., Wilcox B.A., Wright J. (1985): Genetic distances and the taxonomy of checkerspot butterflies (Nymphalidae, Nymphalinae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 53: 403-412.

Brussard P.F., Boughman J.F., Murphy D.D., Ehrlich P.R. Wright J. (1989): Complex population differentiation in checkerspot butterflies (*Euphydryas* spp.). *Canadian Journal of Zoology* 67: 330-335.

Caldas A., Hawthorne D. J., Barbosa P. (2002): Isolation and characterization of microsatellite markers from *Zale galbanata* (Lepidoptera: Noctuidae) and amplification in other members of the genus. *Molecular Ecology Notes* 2: 296-297.

Carlson J.E., Tulsieram L.K., Glaubitz J.C., Luk V.W.K., Kauffeldt C., Rutledge R. (1991): Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 194-200.

Cassel A. (2002): Characterization of microsatellite loci in *Coenonympha hero* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Ecology Notes* 2: 566-568.

Chatterjee S.N., Mohandas T.P. (2003): Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori*. *Genome* 46: 428-447.

Chatterjee S.N., Vijayan K., Roy G.C., Nair C.V. (2004): ISSR Profiling of Genetic Variability in the Ecotypes of *Antheraea mylitta* Drury, the Tropical Tasar Silkworm. *Russian Journal of Genetics* 40: 210-217.

Culley T.M., Wolfe A.D. (2001): Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity* 86: 545-556.

Dampf A. (1910): Untersuchung der Generationsorgane einiger Melitaeen-Arten. *Deutsche Entomologische Zeitschrift Iris* 23: 138-146.

De Leon J.H., Jones W.A. (2004): Detection of DNA Polymorphism in *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae) by Polymerase Chain Reaction-Based DNA Fingerprinting Methods. *Genetics* **97**: 574-584.

DeVries P.J., Kitching I.J., Vane-Wright R.I. (1985): The systematic position of *Antirhea* and *Caerois*, with comments on the classification of the Nymphalidae (Lepidoptera). *Systematic Entomology* **10**: 11-32.

Dice L.R.: (1945): Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26**: 297-302.

Ebert G., Rennwald E. (1991): Die Schmetterlinge Baden-Württembergs, Band I, Tagfalter I. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

Ehrlich P.R. (1958): The comparative morphology, phylogeny and higher classification of the butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea). *The University of Kansas Science Bulletin* **39**: 305-370.

Ehrlich P.R. (1961): Has the biological species concept outlived its usefulness? *Systematic Zoology* **10**: 167-176.

Ehrlich P.R. (1965): The population biology of the butterfly *Euphydryas editha*. II. The structure of the Jasper ridge colony. *Evolution* **19**: 327-336.

Ehrlich P.R. (1983): Butterfly nomenclature, stability, and the rule of obligatory categories. *Systematic Zoology* **32**: 451-453.

Ehrlich P.R. (1984): The structure and dynamics of butterfly populations. In: Vane-Wright R. I., Ackery P. R. (eds.): *The Biology of Butterflies*. Princeton University Press Princeton, New Jersey: 25-40.

Ehrlich P.R. (1992): Population biology of checkerspot butterflies and the preservation of global biodiversity. *Oikos* **63**: 6-12.

Ehrlich P.R., Hanski I. (2004): On the wings of checkerspots: a model system for population biology. Oxford University Press, Oxford.

Ehrlich P.R., Mason L.G. (1966): The population biology of the butterfly *Euphydryas editha*. III. Selection and the phenetics of the Jasper Ridge colony. *Evolution* **20**: 165-173.

Ehrlich P.R., Murphy D.D. (1981a): Butterfly nomenclature: A critique. *Journal of Research on the Lepidoptera* **20**: 1-11.

Ehrlich P.R., Murphy D.D. (1981b): The population biology of checkerspot butterflies (*Euphydryas*). *Biologisches Zentralblatt* **100**: 613-629.

Ehrlich P.R., Murphy D.D., Singer M.C., Sherwood C.B. (1980): Extinction, reduction, stability and increase: The responses of checkerspot butterfly (*Euphydryas*) populations to the California drought. *Oecologia* **46**: 101-105.

Ehrlich P.R., Raven P.H. (1964): Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution* **18**: 586-608.

Ehrlich P.R., White R.R. (1980): Colorado checkerspot butterflies: Isolation, neutrality, and the biospecies. *The American Naturalist* **115** 328-341.

Ehrlich P.R., Wilson E.O. (1991): Biodiversity studies: Science and policy. *Science* **253** 758-762.

Ellsworth D.L., Rittenhouse K.D., Honeycutt R.L. (1993): Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Bio Techniques* **14**: 214-217.

Esselmann E.J., Liangqiang D.J., Crawford J.L., Windus J.L., Wolfe A.D. (1999): Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperta* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* **8**: 443-451.

Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005): Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47-50.

Fang D.Q., Rose M.L. (1997): Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* **95**: 408-417.

Feber R.E., Bourn N., Brereton T., Warren M. (2000): Site dossier and status of the Heath Fritillary (*Mellicta athalia*) on Exmoor in 1999. Butterfly Conservation, Wareham.

Felsenstein J., (2005): PHYLIP Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-166.

Figurny-Puchalska E., Gadeberg R.M.E., Boomsma J.J. (2000): Comparison of genetic population structure of the large blue butterflies *Maculinea nausithous* and *M. teleius*. *Biodiversity and Conservation* **9**: 419-432.

Flanagan N.S., Blum M.J., Davison A. et al. (2002) : Characterisation of microsatellite loci in neotropical *Heliconius* butterflies. *Molecular Ecology Notes* **2**: 398-401.

Fruhstorfer H. (1910): Neue palaearktische Rhopaloceren. *Societas entomologica* **25**: 50-52.

Gallusser S., Guadagnuolo R., Rahier M. (2004): Genetic (RAPD) diversity between *Oleria onega agarista* and *Oleria onega* ssp. (*Ithomiinae*, Nymphalidae, Lepidoptera) in northeastern Peru. *Genetica* **121**: 65-74.

Garner K.J., Slavicek J.M. (1996): Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moths. *Insect molecular biology* **5**: 81-91.

Graham R.L., Foulds L.R. (1982): Unlikelihood that minimal phylogenies for a realistic biological study can be constructed in reasonable computational time. *Mathematical Biosciences* **60**: 133-142.

Gupta M., Chyi Y.-S., Romero-Severson J., Owen J.L. (1994): Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* **89**: 998-1006.

Hadrys H., Balick M., Schierwater B. (1992): Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* **1**: 55-63.

Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P. D. (2001): PAST: Palaeontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**: 1-9.

Hanski I. (2003): Biology of extinctions in butterfly metapopulations. In: Boggs C. L., Watt W. B., Ehrlich P. R. (eds.): *Butterflies: Ecology and Evolution taking flight*. University of Chicago Press, Chicago – London: 577-602.

Hanski I., Kuussaari M., Nieminen M. (1994): Metapopulation structure and migration in the butterfly *Melitaea cinxia*. *Ecology* **75**: 747-762.

Hanski I., Pakkala T., Kuussaari M., Lei G. (1995): Metapopulation persistence of an endangered butterfly in a fragmented landscape. *Oikos* **72** 21-28.

Hanski I., Singer M. (2001): Extinction-colonisation dynamics and host-plant choice in butterfly metapopulations. *The American Naturalist* **158**: 341-353.

Harper G.L., Piyapattanakorn S., Goulson D., Maclean N. (2000): Isolation of microsatellite markers from the adonis blue butterfly (*Lysandra bellargus*). *Molecular Ecology* **9**: 1948-1949.

Harvey D.J. (1991): Higher classification of the Nymphalidae. In: Nijhout H. F. (ed.): *The Development and Evolution of Butterfly Wing Patterns*. Smithsonian Institution Press: 255-273.

Heckel D.G., Gahan L.J., Daly J.C., Trowell S. (1998): A genomic approach to understanding *Heliothis* and *Helicoverpa* resistance to chemical and biological insecticides. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* **353**: 1751-1756.

Hesselbarth G., Van Oorschot H., Wagener S. (1995): Die Tagfalter der Türkei unter Berücksichtigung der angrenzenden Länder. 3 Bände. Selbstverlag Sigbert Wagener, Bocholt.

Higgins L.G. (1932): Some observations upon *Melitaea athalia* Rott. *Entomologist* **17**: 224-226.

Higgins L.G. (1955): A descriptive catalogue of the genus *Mellicta* Billberg (Lepidoptera : Nymphalidae) and its species, with supplementary notes on the genera *Melitaea* and *Euphydryas*. *Transactions of the Royal Entomological Society of London* **106**: 1-131.

Higgins L.G. (1978): A revision of the genus *Euphydryas* Scudder (Lepidoptera: Nymphalidae). *Entomologist's Gazette* **29**: 109-115.

Higgins L.G. (1981): A revision of *Phyciodes* Huebner and related genera, with a review of the classification of the Melitaeinae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Bulletin of the British Museum of Natural History* **43**: 177-243.

Hollingsworth P.M., Tebbitt M., Watson K.J., Gornall R.J. (1998): Conservation genetics of an arctic species, *Saxifraga rivularis* L., in Britain. *Botanical Journal of the Linnean Society* **128**: 1-14.

Hormuzaki C. von (1911): Die systematische und morphologische Stellung der bukowiner Formen von *Melitaea athalia* Rott. und *M. aurelia* Nick. *Zeitschrift für wissenschaftliche Insektenbiologie* **7**: 213-218, 261-267.

Huff D.R., Peakall R., Smouse P.E. (1993): RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchloe dactyloides* [Nutt.] Englem.). *Theoretical and Applied Genetics* **86**: 927-934.

Hundsörfer A.K., Wink M. (2005): New source of Genetic Polymorphisms in Lepidoptera? *Zeitschrift für Naturforschung* **60**: 618-624.

Iruela M., Rubio J., Cubero J.I., Gil, J., Millan T., (2002): Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 643-651.

Jaccard P. (1908): Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* **4** : 223-270.

Jansen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Bleeker M., Vos P., Zabeau M., Kersters K. (1996): Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* **142**: 1881-1893.

Ji Y.-L., Zhang D.-X., Hewitt G.M., Kang L., Li D.-M. (2003): Polymorphic microsatellite loci for the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and some remarks on their isolation. *Molecular Ecology Notes* **3**: 102-104.

Johannesen J., Veith M., Seitz A. (1996): Population genetic structure of the butterfly *Melitaea didyma* (Nymphalidae) along a northern distribution range border. *Molecular Ecology* **5**: 259-267.

Joshi S.P., Gupta, V.S., Aggarwal R.K., Ranjekar P.K., Brar D.S. (2000) : Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics* **100**: 1311-1320.

Karp A., Kresovich S., Bhat K.V., Ayada W.G., Hodgkin T. (1997): Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI technical bulletin no 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rom, Italien.

Keyghobadi N., Roland J., Strobeck C. (1999): Influence of landscape on the population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). *Molecular Ecology* **8**: 1491-1495.

Keyghobadi N., Roland J., Strobeck C.E. (2002): Isolation of novel microsatellite loci in the Rocky Mountain apollo butterfly, *Parnassius smintheus*. *Molecular Ecology* **8**: 247-250.

Kochieva E.Z., Ryzhova N.N., Khrapalova I.A., Pukhalskyi V.A. (2002): Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships in the Genus *Lycopersicon* (Tour.) Mill. As Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Analysis. *Russian Journal of Genetics* **38**: 1133-1142.

Kolligs D. (2003): Schmetterlinge Schleswig-Holsteins – Atlas der Tagfalter, Dickkopffalter und Widderchen. Wachtholz Verlag: 1-212.

Kons Jr. H.J. (2000): Phylogenetic studies of the Melitaeini (Lepidoptera: Nymphalidae: Nymphalinae) and a revision of the genus *Chlosyne* Butler. PhD dissertation, Departement of Entomology and Nematology, University of Florida.

Kristal P.M. (1987): *Mellicta neglecta* (PFAU 1962) nun auch in der Bundesrepublik Deutschland nachgewiesen (Lepidoptera: Nymphalidae). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo* **8**: 61-76.

Kruskal J.B. (1977): The Relationship between Multidimensional Scaling and Clustering. In: Ryzin R. van (ed.): Classification and Clustering. Academic Press, New York.

Kuussaari M., Nieminen M., Pöyry J., Hanski I. (1995): Täpläverkkoperhosen (*Melitaea cinxia*) elinkierto ja esiintyminen Suomessa. *Baptria* **20**: 167-180.

Lessa E.P. (1990): Multidimensional analysis of geographic genetic structure. *Systematic Zoology* **39**: 242-252.

Lewontin R.C. (1972): The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* **6**: 381-398.

Lin J.J., Kuo J. (1995): AFLP: A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus* **17**: 52-56.

Link W.C., Dixkens C., Singh M., Schwall M., Melchinger A.E. (1995): Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **90**: 27-32.

Lobenstein U. (2003): Die Schmetterlingsfauna des mittleren Niedersachsens. Naturschutzbund Landesverband Niedersachsen und Ulrich Lobenstein.

Mantel N. (1967): The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.

Marschner G. (1981): Der „übersehene“ Scheckenfalter *Melitaea neglecta* PFAU 1962 (Lep., Nymphalidae). *Entomologische Berichte* 1981: 68-70.

Martinelli S., Montrazi Barata R., Zucchi M.I., De Castro Silva-Filho M., Omoto C. (2006): Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. *Journal of Economic Entomology* 99: 519-526.

McKechnie S.W., Ehrlich, P.R., White, R.R. (1975): Population Genetics of *Euphydryas* Butterflies. I Genetic Variation and the Neutrality Hypothesis. *Genetics* **81**: 571-594.

Meekins J.F., Ballard Jr.H.E., McCarthy B.C. (2001): Genetic variation and molecular biogeography of a North American invasive plant species (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae). *International Journal of Plant Sciences* **162**: 161-169.

Megléc E., Petenian F., Danchin E., Coer D'Acier A., Rasplus J-Y., Faure E. (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.

Megléc E., Solignac M. (1998): Microsatellite loci for *Parnassius mnemosyne* (Lepidoptera). *Hereditas* **128**: 179-180.

Mejer D., Mithen R., Lewis B.G., Vos P., Oliver R.P. (1996): The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research* **100**: 1107-1111.

Meunier J.R., Grimont P.A.D. (1993): Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology* **144**: 373-379.

Micheli M.R., Bova R., Pascale E. D'Ambrosio E. (1994): Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Research* **22**: 1921-1922.

Nagaoka T., Ogihara Y. (1997): Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **94**: 597-602.

Nei M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 3321-3323.

Nei M., Li W.-H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 5269-5273.

Nève G., Megléc E. (2000): Microsatellite frequencies in different taxa. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 376-377.

Page R.D.M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 357-358.

Pakniyat H., Powell W., Baird E., Handley L.L., Robinson D., Scrimgeour C.M., Nevo E., Hackett C.A., Caligari P.D.S., Forster B.P. (1997): AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) with reference to salt tolerance and associated ecogeography. *Genome* **40**: 332-341.

-
- Palo J., Varvio S., Hanski I., Vainola R. (1995): Developing microsatellite markers for insect population structure: complex variation in a checkerspot butterfly. *Hereditas* **123**: 295-300.
- Patzak J. (2001): Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods for assessment of genetic diversity in hop (*Homulus lupulus* L.). *Euphytica* **121**: 9-18.
- Petersen B. (1945): *Melitaea britomartis* Assm. und *Melitaea partenie* (Bkh.) (*aurelia* Nick.) in Schweden. *Opuscula Entomologica* **10**: 135-139.
- Pelz V. (1995): Biosystematik der europäischen Arten des Tribus Melitaeini Newman, 1870. *Oedippus* **11**: 1-62.
- Pfau J. (1962): *Melitaea athalia* ROTT. – eine Doppelart (Dualspecies) (Lep. Nymph.). *Mitteilungsblatt für Insektenkunde* **6**: 85-88, 103-110, 142-150.
- Philipps C.B., Cane R.P., Mee J., Chapman H.M., Hoelmer K.A., Coutinot D. (2002): Intraspecific variation in the ability of *Microtonus aethiopoides* (Hymenoptera: Braconidae) to parasitise *Sitonia lepidus* (Coleoptera: Curculionidae). *New Zealand Journal of Agricultural Research* **45**: 295-303.
- Porter A.H., Mueller J.C. (1998): Partial genetic isolation between *Phyciodes tharos* and *P. cocyta* (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* **52**: 182-205.
- Pujar S., Tamhankar S.A., Gupta V.S., Rao V.S., Ranjekar P.K. (2002) : Diversity analysis of Indian tetraploid wheat using Intersimple Sequence Repeat Markers reveals their superiority over Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Biochemical Genetics* **40**: 63-69.
- Raina S.N., Rani V., Kojima T., Ogihara Y., Singh KP, Devarumath R.M. (2001): RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationship in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* **44**: 763-772.

-
- Raup D., Crick R.E. (1979): Measurement of faunal similarity in palaeontology. *Journal of Palaeontology* **53**: 1213-1227.
- Reddy K.D., Abraham E.G., Nagaraju J. (1999): Microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: abundance, polymorphism, and strain characterization. *Genome* **42**: 1057-1065.
- Reddy K.D., Nagaraju J., Abraham E.G. (1999): Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. *Heredity* **83**: 681-687.
- Reineke, A. (1998): Differenzierung von verschiedenen Populationen des Schwammspinners, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera, Lymantriidae), mit Hilfe molekularer Marker. Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart: 1-115.
- Reverdin J.-L. (1920): Note sur *Melitaea athalia* Rott. et diagnose d'une espece nouvelle. *Bulletin, Société entomologique de France* **5**: 319-321.
- Reverdin J.-L. (1922): *Melitaea athalia* Rott. et *Melitaea pseudathalia* nova species (?). *Bulletin de la Société Lépidoptérologique de Genève* **5**: 24-45.
- Reynolds J., Weir B.S., Cockerham C.C. (1983): Estimation for the conacestry coefficient: basis for short-term genetic distance. *Genetics* **105**: 767-779.
- Rezbanyai-Reser L. (1987): Stellungnahme zum Status der problematischen Taxa *alfacariensis* RIBBE 1905 (*Colias*), *bryoniae* HUEBNER 1806 (*Pieris*), *celadussa* FRUHSTORFER 1910 (*Mellicta*) und *aquilionaris* STICHEL 1908 (*Boloria*), (Lepidoptera: Pieridae & Nymphalidae). *Entomologische Berichte Luzern* **17**: 51-60.
- Rieppel O. (1999): Einführung in die computergestützte Kladistik. Verlag Dr. Friedrich Pfeil – München.
- Rocci U. (1931): Ricerche sulle modalità di schiusura e le forme di variazione della cosiddetta *Melitaea athalia* Rott. *Memoire de la SocietaEntomologica Italiana* **10**: 10-35.

Rocci U. (1932): La struttura e la variabilità delle armature maschili in alcuni gruppi specifici del gen. *Melitaea* F. (Lepidopt. – Nymphal.). *Memoire de la Societa Entomologica Italiana* **11**: 123-161.

Roine, Antti (2000): Lepibase 2.0. Butterflies of Europe. Species and Habitat CD. Herausgeber: Atropos

Rollinson D., Stothard J.R. (1994): Identification of pests and pathogens by random amplification of polymorphic DNA (RAPDs). In: Hawksworth D.L. (Ed.): Identification and characterization of pest organisms. Wallingford, CAB International: 447-459

Schadewald G. (1988): Anmerkungen zu *Melitaea neglecta* PFAU, 1962 (Lep., Nymphalidae). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo* **8**: 109-112.

Schmitt T. (1999): Phylogeographie europäischer Tagfalter basierend auf populationsgenetischen Analysen unter besonderer Berücksichtigung von *Polyommatus coridon* und *Polyommatus icarus* (Lepidoptera: Lycaenidae) sowie *Erebia medusa* und *Maniola jurtina* (Lepidoptera: Satyrinae). Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz: 1-131.

Schön C.C., Link, W. (1997): Biometrische Methoden zur Beschreibung genetischer Diversität – Fallbeispiele. In: Schriften zu Genetischen Ressourcen (Band 8): 110-117.

Scoble M.J. (1992): The Lepidoptera: Form, Function and Diversity. The Natural History Museum in association with Oxford University Press, Oxford.

Selonen V. (1997): Kirjoverkkoperhosen (*Euphydryas maturna*) ja ratamoverkkoperhosen (*Mellicta athalia*) populaatiorakenne ja habitaatinvalinta. *Baptria* **22**: 137-144.

Settele J., Feldmann R., Reinhardt R. (1999): Die Tagfalter Deutschlands. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

Shannon C.E., Weaver W. (1949): The mathematical theory of communication. University of Illinois Press.

Sharma S.K., Knox M.R., Ellis T.H.N. (1996): AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **93**: 751-758.

Sheldon W.G. (1916): The male ancillary appendages of European species of the *Athalia* group of the genus *Melitaea*. *Entomologist's Record and Journal of Variation* **28**: 261-264.

Singer M.C. (1971a): Ecological studies on the butterfly *Euphydryas editha*. PhD dissertation, Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford, CA.

Singer M.C. (1971b): Evolution of food-plant preference in the butterfly *Euphydryas editha*. *Evolution* **25**: 383-389.

Singer M.C. (2003): Spatial and temporal patterns of checkerspot butterfly-host plant association: The diverse roles of oviposition preference. In: Boggs C. L., Watt W. B., Ehrlich P. R. (eds.): *Butterflies: Ecology and Evolution taking flight*. University of Chicago Press, Chicago – London: 207-228.

Singer M.C. (1984): Butterfly-hostplant relationships: Host quality, adult choice and larval success. In: Vane-Wright R. I., Ackery P. R. (eds.): *The Biology of Butterflies* Princeton University Press Princeton, New Jersey: 81-88.

Singer M.C., Ehrlich P.R. (1979): Population dynamics of the checkerspot butterfly *Euphydryas editha*. *Fortschritte der Zoologie* **25**: 53-60.

Slatkin M. (1995): A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**: 457-462.

Storch V., Welsch U., Wink, M. (2001): *Evolutionsbiologie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York: 1-447.

Suschkin P. (1913): Zur anatomischen Begründung einiger paläarktischer Arten der Gattung *Melitaea* F. (Rhopal., Nymphal.). *Zeitschrift für wissenschaftliche Insektenbiologie* **10**: 321-325.

Swofford D.L. (2002): PAUP*. Phylogenetic Analyses Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tolman T., Lewington R. (1998): Die Tagfalter Europas und Nordwestafrikas. Franck-Kosmos-Verlags-GmbH & Co, Stuttgart: 1-319.

Tsumura Y., Ohba K., Strauss S.H. (1996): Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 40-45.

Vawter A.T., Brussard P.F. (1975): Genetic stability of populations of *Phyciodes tharos* (Nymphalidae: Melitaeinae). *Journal of the Lepidopterists' Society* **29**: 15-23.

Verity R. (1940): Revision of the *athalia* group of the genus *Melitaea* Fabricius, 1807 (Lepidopt., Nymphalidae). *Transactions of the Royal Entomological Society of London* **89**: 591-706.

Volpe G., Palmieri R., Jutzeler, D. (2005): Nouveaux sites de *Melitaea diamina* (Lang, 1789) en Italie centro-méridionale avec discussion du statut taxinomique de deux populations montrant des différences dans la forme et le dessin des ailes (*Lepidoptera* : *Nymphalidae*). *Linneana Belgica* **20**, 3: 103-111.

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 Research* **23**: 4407-4414.

Wägele J.-W. (2001): Grundlagen der Phylogenetischen Systematik. Verlag Dr. Friedrich Pfeil – München.

Wahlberg N. (1995): Täpläverkkoperhosen (*Melitaea cinxia*) lisääntymisbiologia. *Baptria* **20**: 181-188.

Wahlberg N. (1997a): The life history and ecology of *Melitaea diamina* (Nymphalidae) in Finland. *Nota Lepidopterologica* **20**: 70-81.

Wahlberg N. (1997b): Ratamoverkkoperhosen (*Mellicta athalia*) elinkierto Etelä-Suomessa. *Baptria* **24**: 149-153

Wahlberg N. (2000): Comparative descriptions of the immature stages and ecology of five Finnish melitaeine butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae). *Entomologica Fennica* **11**: 167-174.

Wahlberg N., Zimmermann M. (2000): Pattern of phylogenetic relationships among members of the tribe Melitaeini (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from mtDNA sequences. *Cladistics* **16**: 347-363.

Warren M.S. (1987a): The ecology and conservation of the heath fritillary butterfly, *Mellicta athalia*. I. Host selection and phenology. *Journal of Applied Ecology* **24**: 467-482.

Warren M.S. (1987b): The ecology and conservation of the heath fritillary butterfly, *Mellicta athalia*. II. Adult population structure and mobility. *Journal of Applied Ecology* **24**: 483-498.

Warren M.S. (1987c): The ecology and conservation of the heath fritillary butterfly, *Mellicta athalia*. III. Population dynamics and the effect of habitat management. *Journal of Applied Ecology* **24**: 499-513.

Warren M.S. (1991): The successful conservation of an endangered species, the Heath Fritillary *Mellicta athalia* Rott. in Britain. *Biological conservation* **55**: 37-56.

Watt W.B., Boggs C.L. (2003): Butterflies as model systems in ecology and evolution: Present and future. In: Boggs C. L., Watt W. B., Ehrlich P. R. (eds.): *Butterflies: Ecology and Evolution*

taking flight. University of Chicago Press, Chicago – London: 603-613.

Weeden N.F., Timmermann G.M., Hemmat M., Kneen B.E., Lodhi M.A. (1992): Inheritance and reliability of RAPD markers. In: *Applications of RAPD technology to plant breeding: Joint Plant Breeding Symposia Series; 1 November 1992, Minneapolis, Minnesota*. Crop Science Society of America, American Society for Horticultural Science, American Genetic Association: 12-17.

Weidemann H.-J. (1995): Tagfalter: beobachten, bestimmen. Naturbuch-Verlag – Augsburg: 1-659.

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531-6535.

Wolfe A.D., Liston A. (1998): Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis P.S., Soltis D.E., Doyle J.J. (eds.): *Plant Molecular Systematics II*. Kluwer Academic Publishers, Boston: 43-86.

Wolfe A.D., Randle C.P. (2001): Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. *Systematic Botany* **26**: 120-130.

Wolfe A.D., Xiang Q.Y., Kephart, S. R. (1998): Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 5112-5115.

Wright S. (1978): *Evolution and the genetics of populations*. Vol 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press: 1-580.

Xiao L.-Q., Ge X.-J., Gong X., Hao G., Zheng S.-X. (2004): ISSR Variation in the Endemic and Endangered Plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany* **94**: 133-138.

Yeh F.C., Boyle T.J.B. (1997): Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* **129**: 157.

Zietkiewicz E., Rafalske A., Labuda D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genome* **20**: 178-183.

Zimmermann M., Wahlberg N., Descimon H. (2000): A phylogeny of *Euphydryas* checkerspot butterflies (Lepidoptera; Nymphalidae) based on mitochondrial DNA sequence data. *Annals of the Entomological Society of America* **93**: 347-355.

7. Abkürzungen und Symbole

#	Nummer („number“)
%	Prozent
&	und
·	Sekunde (topographisch)
<	kleiner als
Σ	Summe
°	Grad (topographisch)
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
♀	Weibchen
♂	Männchen
∞	unendlich
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AFLP	„Amplified Fragment Length Polymorphism“
Baden-Württembg.	Baden-Württemberg
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BR	Bundesrepublik
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cm	Zentimeter
coll.	Sammlung (lateinisch: „collectio“)
D	Deutschland
d. h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat

dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("desoxyribonucleid acid")
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
e. l.	aus der Larve („ex larva“)
e. o.	aus dem Ei („ex ovo“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und weitere („et alii“)
etc.	und weiteres („et cetera“)
Fa.	Firma
EthBr	Ethidiumbromid
F_{st}	Fixationsindex
G	Guanin
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Gr.	Groß(es)
ha	Hektar
ISSR	„Inter Simple Sequence Repeats“
km	Kilometer
leg.	legit (lateinisch: „hat gesammelt“)
Lep.	Lepidoptera
Lig.	Ligurien
m	Meter
MDS	Multidimensionale Skalierung
Mg^{2+}	zweifach positiv geladenes Magnesium-Ion
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MP	„Maximum Parsimony“
n	Anzahl

nm	Nanometer
<i>Nm</i>	Anzahl der in andere Populationen einwandernde Tiere pro Generation (“number of migrants per generation”)
nmol	Nanomol
nördl.	nördlich
NSG	Naturschutzgebiet
oberhbl.	oberhalb
östl.	östlich
OT	Ortsteil
OTU	Operational Taxonomic Unit
p B	polymorphe Banden
PCO	Principal Coordinate Analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pp-ISSR	„primer-pair Inter Simple Sequence Repeats“
pp-RAPD	„primer-pair Random Amplified Polymorphic DNA“
RAMP	„Randomly Amplified Microsatellite Polymorphism“
RAPD	„Random Amplified Polymorphic DNA“
resp.	respektive (beziehungsweise)
Rev.	Reverdin
RFLP	„Restriction Fragment Length Polymorphism“
Rheinld.	Rheinland
<i>Rm</i>	Korrelationswert beim Manteltest
RNA	Ribonukleinsäure (“ribonucleic acid”)
s	Sekunde(n)
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SAMPL	„Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci“
sog.	sogenannt, sogenannter (je nach Kontext)
spec.	species (Ersatz für Artbezeichnung)
ssp.	Unterart („subspecies“)

SSR	„Simple Sequence Repeat“
Std.	Stunden
Südfr.	Südfrankreich
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Natriumacetat-Puffer mit EDTA
TBE	Tris/Borat-Puffer mit EDTA
U	„unit“
u. U.	unter Umständen
UBC	University of British Columbia
unterh.	unterhalb
UPGMA	„Unweighted Pairgroup Method using Arithmetic Averages“
UV	ultraviolett
VBG	Vorarlberg
vic.	benachbart (lateinisch: „vicinus“)
z. B.	zum Beispiel

8. Anhang

8.1 Material

8.1.1 Chemikalien

Agarose (Seakem LE [®])	Cambrex Bio Science, Baltimore
Agarose (NUSieve [®])	Cambrex Bio Science, Baltimore
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
dNTPs	Promega, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Tris-Acetat	AppliChem, Darmstadt
Tris-Base	Biomol, Hamburg

8.1.2 Eingesetzte Lösungen und Puffer

Agarose-Gel (1%, 1,5%, 2%)	Agarose(2 g, 3 g, 4 g) in 200 ml TAE-Puffer (1x)
DNA – Probenpuffer	100 mM EDTA 43% (v/v) Glycerol 0,05% (w/v) BPB
dNTP-Mix	2 mM dATP 2 mM dCTP 2 mM dGTP 2 mM dTTP
EthBr-Stammlösung (1%)	100 mg in 10 ml H ₂ O (reinst)
PCR-Puffer (10x)	“Taq Buffer with Mg ²⁺ “, Mg ²⁺ -Gehalt 1,5 mM (Eppendorf, Hamburg)
Q-Solution	Qiagen, Hilden
TAE-Puffer (50x, pH 8,3)	2 M Tris-Base 0,5 M Natriumacetat 50 mM EDTA in H ₂ O (reinst)

TBE-Puffer (10x, pH 8,3)	1340 mM Tris-Base
	45 mM Borsäure
	25 mM EDTA in H ₂ O (reinst)

8.1.3 DNA-Längenstandard

Superladder-mid1 100 bp/500 bp	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
O'RangeRuler™ 200 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp DNA Ladder	Invitrogen
250 bp DNA Ladder	Invitrogen

8.1.4 Enzyme

Proteinase K	Sigma, München
Taq DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg , Quiagen GmbH, Hilden
HotMaster Taq DNA Polymerase	Eppendorf AG, Hamburg

8.1.5 Primer

Primer Set #9	University of British Columbia Biotechnology Laboratory, Vancouver, BC, Canada
---------------	---

8.1.6 Kits

Qiamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
---------------------	----------------

8.1.7 Geräte

Dokumentationssysteme	Gel Print 1000i, BioPhotonics Corporation; Sony Black and White Monitor SSM-930 CE, Sony
Pipetten /2, 10, 20, 200 und 1000 µl	ABIMED, Langenfeld
Reinstwasseranlage	Reinstwasser-System clear plus, SG Wasseraufbereitung- und Regenerierstation GmbH
Spannungsregler	Power Pac 200, Bio-Rad Laboratories GmbH
Stickstofftransportkanne	Airliquide GT3

Thermocycler	PTC-200 Peltier Thermal Cyclers, MJ Research, Waltham, Mass., USA
UV-Leuchttisch	TFX-20.M UV-Leuchttisch, Vilber Lourmat
Vortexer	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Zentrifuge	Biofuge pico, Heraeus Instruments GmbH

8.1.8 Verbrauchsmaterialien, Laborbedarf

Kunststoffmaterialien (Kryoröhrchen, Lagerboxen, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc.)	Biozym, Fischer Scientific, Hartenstein, Roth
Glasgeräte (Bechergläser, Messzylinder etc.)	Schott, Hirschmann

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Johann Wolfgang Wägele danke ich sehr herzlich für seine Betreuung in den vergangenen Jahren. Sein Interesse am Fortgang meiner Untersuchungen, seine wertvollen Anregungen und Hinweise, sein Vertrauen und seine Geduld sowie die jederzeit gewährte Unterstützung haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Stützel bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Dissertation.

Herrn PD Dr. Peter Roos verdanke ich das Interesse an phylogenetischen Fragestellungen und letztlich den Kontakt zu Herrn Prof. Dr. Wägele.

Für die tolle Arbeitsatmosphäre am Lehrstuhl, aber auch für interessante Gespräche, Hinweise und Diskussionen bedanke ich mich bei Dr. Ulrike Englisch, Dr. Christoph Held, Florian Leese, Dr. Christoph Meyer, Oliver Schultz und ganz besonders bei Dr. Michael Raupach.

Bei Frau Beate Hackethal bedanke ich mich für die Einführung in die spezifischen Arbeitsweisen im DNA-Labor. Bei jeglichen Problemen, aber auch bei der Organisation und Beschaffung von Chemikalien und Arbeitsmaterialien war ihre Hilfe unverzichtbar.

Dem Computerfachmann Ingo Manstedt verdanke ich die technische Unterstützung bei der direkten Übertragung der unter UV-Licht gemachten Fotos von den mit Ethidiumbromid gefärbten Gelen auf die Festplatte meines Computers.

Simone Jannett konnte jederzeit in allen Verwaltungsangelegenheiten um Rat gefragt werden.

Wilfried Arnscheid, Dr. Thomas Schmitt und Dr. Niklas Wahlberg haben mir wertvolles Untersuchungsmaterial beschafft. Da ich aus eigener Erfahrung weiß, wie mühsam das sein kann, bin ich Ihnen in besonderer Weise zum Dank verpflichtet.

Um zur richtigen (Flug-)Zeit am richtigen (Fund-)Ort zu sein, benötigt man in unbekanntem Gelände oft Hinweise von „Insidern“: Dr. Eyjolf und Ulrich Aistleitner gaben mir diese in detaillierter Form für Vorarlberg und Liechtenstein, Axel Kallies und Rolf Reinhardt für Sachsen und Brandenburg, Dr. Thomas Schmitt für Rheinland-Pfalz.

Bei Dr. Ulf Eitschberger und Dr. Martin S. Warren bedanke ich mich für die zur Verfügung gestellte Literatur, bei Heinz Rothacher für Zuchtmaterial von Melitaeen.

Das Sammeln von Schmetterlingen unterliegt heutzutage oftmals gesetzlichen Einschränkungen. Für die Erteilung von Ausnahmegenehmigungen zur Entnahme von Faltern und für die Arbeit in Naturschutzgebieten danke ich daher dem „Amt für Landschaftsökologie der Autonomen Provinz Bozen-Südtirol“ sowie der „Vorarlberger Naturschau“, Feldkirch.

Auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern meiner Apotheke bin ich zu Dank verpflichtet. Auf sie konnte ich mich immer verlassen, was mir bei meinen Untersuchungen sehr geholfen hat.

Meine Eltern haben meine Leidenschaft für den wissenschaftlichen Umgang mit Schmetterlingen schon früh gefördert. Ihre seelische und praktische Unterstützung hat mir viel Kraft gegeben, mein Forschungsvorhaben in die Tat umzusetzen.

Mein allergrößter Dank gebührt jedoch meiner Frau Gabriele und meinen Kindern Sebastian und Daniel. Sie haben mich nicht nur moralisch unterstützt, sondern mir bei vielen Dingen des Alltags den Rücken frei gehalten. Dazu kam noch tatkräftige Hilfe, indem sie sich an der Suche nach Scheckenfaltern bei zahlreichen Exkursionen im In- und Ausland aktiv beteiligt haben. Oftmals haben sie wegen meiner Forschungsarbeiten auf mich verzichten müssen. Ohne das Verständnis und die große Geduld meiner Familie hätte diese Arbeit nicht abgeschlossen werden können. Vielen, vielen Dank!

10. Lebenslauf

Name:	Gerdo Ulrich Achtelik	
Geburtsdatum	15.1.1960	
Geburtsort	Walsum (jetzt Duisburg)	
Eltern	Dipl. Ing. Norbert Achtelik und Lehrerin Irene Achtelik, geb. Rockel	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
Familienstand	verheiratet seit dem 2.8.1985 mit der Apothekerin Gabriele Achtelik, geb. Suchopar	
Kinder	2 Söhne: Sebastian, geb. 18.9.1990 und Daniel, geb. 15.6.1992	
Schulbildung	1966 - 1969	Dionysius-Volksschule, Essen
	1969 - 1975	Gymnasium Essen-Borbeck
	1975 - 1978	Heinrich-Heine-Gymnasium, Bottrop
Studium	1979 - 1983	Pharmazie-Studium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
	1983 - 1984	Praktische Ausbildung in der „Bahnhof-Apotheke“, Essen-Borbeck
Beruf	Juli 1984	Staatsexamen und Erteilung der Approbation als Apotheker
	Juli 1984 - 30.6.1989	Apotheker in der „Germania-Apotheke“, Essen-Borbeck, unterbrochen durch den Wehrdienst
	4.3.1987 - 3.6.1988	Wehrdienst als Stabsapotheker, vom 1.5.1987 - 3.6.1988 Leiter der Abteilung Galenik / Analytik im Bundeswehrkrankenhaus Hamm
	1.7.1989 - 30.6.1996	Apotheker in der „Rathaus-Apotheke“, Bochum
	seit 1.7.1996	Apothekenleiter der selbständig betriebenen „Apotheke am Husemannplatz“, Bochum
	1997	Weiterbildung zum „Apotheker für Offizin-Pharmazie“