

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Tierökologie

DNA-Taxonomie in der Entomologie  
Eine Fallstudie der DNA-basierten Systematik bei Insekten

Michael Andreas Miller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Reinhard Schopf

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Back (i. R.)
2. Univ.-Prof. Dr. D. Metzler, Ludwig-Maximilians-Universität München
3. Univ.-Prof. Dr. J. P. Geist

Die Dissertation wurde am 04.05.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.07.2012 angenommen.



Meinen Eltern und meinen Söhnen  
Sebastian, Korbinian und Johannes  
und Ulla.



Triumphe halten keine Lehren bereit,  
Mißerfolge dagegen befördern die  
Erkenntnis auf mannigfaltige Art

Hans Magnus Enzensberger



**DNA-Taxonomie in der Entomologie**  
**Eine Fallstudie der DNA-basierten**  
**Systematik bei Insekten**

Michael A. Miller

Freising





## Danksagung

Mein großer Dank gebührt Prof. Dr. Werner Back, der die Betreuung der Arbeit übernommen hat, und Prof. Dr. Roland Gerstmeier für die wissenschaftliche Unterstützung und Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe am Lehrstuhl für Tierökologie des Wissenschaftszentrums Weihenstephan.

Besonders danken möchte ich Dipl.-Biol. Ulla Oliveira Biener, Dipl.-Biol. Stefan Friedrich und Prof. Dr. Roland R. Melzer, die mich freundschaftlich und ideell anleiteten und ermutigten.

Herzlich gedankt sei an dieser Stelle allen Mitautoren. Es war eine anspruchsvolle Herausforderung, mit Euch zusammenzuarbeiten, ich konnte viel von Euch lernen und es hat mir Spaß gemacht, mich in die jeweiligen Taxa und Fragestellungen einzuarbeiten. Namentlich erwähnen möchte ich (alphabetisch sortiert): Werner Back, Michael Balke, Ulf Buchsbaum, Verena Etscher, Günter Müller, Axel Hausmann, Axel Hille, Thomas Knebelsberger, Torsten Laamanen, Rudolf Meier, Günter Müller, Paul Opler, Ignacio Ribera, Wolfgang Speidel, Wolfgang ten Hagen und Alfried Vogler.

Dankend erwähnen möchte ich nochmals Prof. Dr. Diethard Tautz (MPI f. Evolutionsforschung, Plön), der mir die DNA-Analyse beibrachte und die DNA-Taxonomie erfand, sowie die Leute aus seinem damaligen Labor des Zoologischen Instituts der LMU in München, die das Tagesgeschäft der Lehre übernahmen, besonders (alphabetisch sortiert): Andreas Berghammer, Christoph Eckert, Claudia Englbrecht, Melanie Markmann, Nico Prpic, Kornelia Rassmann, Sebastian Steinfartz, Barbara Wimmer. Erst im Lauf der Karriere wird einem die Bedeutung der Schule, aus der man kommt, bewusst.



**Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis.....	8
Abbildungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung und Problemstellung .....	10
1.1 Neue Herausforderungen.....	10
1.2 Lösungsansätze.....	11
2. Theoretische und methodologische Grundlagen .....	12
2.1 Die Historie der Molekularen Analysen .....	12
2.2 Die DNA-Taxonomie .....	13
2.3 Der Artbegriff.....	16
2.4 Vorstellung der untersuchten Themenkomplexe .....	17
3. Material und Methoden .....	25
3.1 DNA-Extraktion .....	25
3.2 Analyseverfahren .....	26
3.3 Neubeschreibungen .....	28
3.4 Artabgrenzungen/Phylogenie.....	30
3.5 Identifikationen.....	33
3.6 Ökologische Anwendungen .....	35
4. Ergebnisse und Diskussion .....	36
4.1 DNA-Extraktion .....	36
4.2 Analyseverfahren .....	37
4.3 Neubeschreibungen .....	42
4.4 Artabgrenzungen/Phylogenie.....	47
4.5 Identifikationen.....	64
4.6 Ökologische Anwendungen .....	69
5. Zusammenfassung .....	74
6. Literaturverzeichnis.....	77
7. Weitere eigene Veröffentlichungen.....	104

**Abkürzungsverzeichnis**

bp	Basenpaar(e)
CI	Consistency index
COI	Cytochromoxidase Untereinheit I
ILD	Inkongruenz-Längendifferenz
ML	Maximum Likelihood
MP	Maximum Parsimony
mtDNA	mitochondriale Desoxribonukleinsäure
nDNA	nukleäre Desoxribonukleinsäure
NJ	Neighbor Joining
PBS	Partitionierter Bremer-Support
PP	Posterior Probability
RI	Retention index
RILD	bewertete Inkongruenz-Längendifferenz
ti	Transition
tv	Transversion

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Abhängigkeit des PCR-Erfolgs vor der Probenhistorie.....	37
Abbildung 2: Phylogenie der Gattung <i>Themira</i> .....	41
Abbildung 3: Holotypen der neubeschriebenen <i>Leucoblepsis taiwanensis</i> sp. nov.....	42
Abbildung 4: Tabelle der variablen Basenpositionen bei <i>Leucoblepsis taiwanensis</i> sp.nov.....	42
Abbildung 5: Tabelle der variablen Basenpositionen bei <i>Paracymoriza naumanniella</i> sp. nov....	43
Abbildung 6: Typen von <i>Paracymoriza naumanniella</i> sp. nov.....	44
Abbildung 7: <i>Idaea nigra</i> Hausmann & Bläsius sp. nov.....	45
Abbildung 8: Holotypen der neubeschriebenen <i>Colias</i> -Arten.....	46
Abbildung 9: Netzwerkanalyse der Unterarten von <i>Anthocharis cardamines</i> .....	48
Abbildung 10: Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse der Untergattung <i>Elphinstonia</i> .....	50
Abbildung 11: Distanzanalyse-Baum der Gattungen <i>Euchloe</i> und <i>Iberochloe</i> gen. nov.....	52
Abbildung 12: Boxplots der genetischen Distanzen in der Artengruppe II von <i>Euchloe</i> .....	56
Abbildung 13: Boxplots der genetischen Distanzen in der Artengruppe V von <i>Euchloe</i> .....	57
Abbildung 14: NJ-Baum der Gattung <i>Callophrys</i> nebst Außengruppenvertretern.....	59
Abbildung 15: Network-Analyse der untersuchten <i>Callophrys</i> und Außengruppen.....	60
Abbildung 16: Phylogenie der Gattung <i>Rhantus</i> .....	62
Abbildung 17: NJ – Analyse der genetischen Distanzen von <i>D. tutti</i> und <i>D. chrysitis</i> .....	65
Abbildung 18: Tabelle der variablen Sequenzpositionen bei <i>Polythore spaeteri</i> . ....	66
Abbildung 19: Strikter Konsensusbaum der <i>Phyllodromica subaptera</i> -Artengruppe.....	68
Abbildung 20: Distanzbaum (UPGMA) der untersuchten Raupen und der Referenztaxa.....	70
Abbildung 21: Abhängigkeit der Detektionserfolges von der Ingestionsdauer.....	72

**Hinweis:**

Aus dieser Dissertation wurden bereits einige Teilaspekte publiziert. Die einzelnen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit werden deshalb im Folgenden teilweise etwas kursorisch dargestellt und übergreifend diskutiert. Für eine detaillierte und umfangreiche Darstellung der Literatordiskussion, des Material- und Methodenteils sowie der Ergebnisse wird in diesen Fällen auf die aus dieser Dissertation entstandenen Veröffentlichungen verwiesen (siehe Literaturverzeichnis).

# 1. Einleitung und Problemstellung

Das Erkennen und Begreifen der belebten Umwelt ist seit jeher kultureller Bestandteil des modernen Menschen. Schon in der Steinzeit wurden die jagdbaren Tiere in Fels- und Höhlenmalereien dokumentiert. Aristoteles versuchte eine systematische Ordnung bei den damals bekannten und unterscheidbaren Organismen einzuführen. Als Carl von Linné mit seinem *Systema Naturae* der Auflage von 1758 das binominale Benennungssystem aus lateinischem Gattungs- und Artnamen einführte, war die moderne Taxonomie geboren. Er führte die sog. "Merkmale" ein, die die Arten voneinander abgrenzen, wenn sie sich in mindestens einem davon konstant unterscheiden.

Lange war dies eine hinreichende Methode, den immer größer werdenden Wissensschatz über die verschiedenen Tier- und Pflanzenarten zu benennen und zu klassifizieren, mithin eine Systematik zu begründen.

## 1.1 Neue Herausforderungen

In neuerer Zeit kam es einerseits zu dem Bewusstsein, dass mit der fortschreitenden Umweltzerstörung und wegen der fehlenden Spezialisten die Gesamtheit der existierenden Arten wohl nicht wissenschaftlich beschrieben werden kann, bevor der Artenschwund diese dezimiert haben wird und viele von ihnen unwiederbringlich verloren sind. Andererseits erschloss sich mit der Erfindung der primergebundenen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 1986 (Saiki et al.) und der DNA-Sequenzierung durch farblich markierte Terminatoren ab 1977 (Sanger et al.) ein zusätzliches Merkmalsset, das später im Hochdurchsatz individuengenaue Identifikationen ermöglichte und damit das Erkennen von neuen und bekannten Arten stark beschleunigte.

Die Molekulare Phylogenetik wurde in den späten 1950er Jahren unter anderem von Charles G. Sibley bei Vögeln, Morris Goodman bei Primaten, dann Allan C. Wilson und John C. Avise mit diversen Arbeiten aus der Taufe gehoben und grundlegend geprägt. Heute gibt es kaum eine Tier- oder Pflanzengruppe, die noch nicht molekulaphylogenetisch untersucht wurde und die Ergebnisse in den einschlägigen Journalen (zum Beispiel *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *Molecular Ecology*) publiziert wurden.

Betrachtet man diese Arbeiten aus systematisch-taxonomischer Sicht fällt auf, dass sie oft den taxonomischen Mindestanforderungen nicht genügen. Die Probestiere, die für die Untersuchungen verwendet wurden, waren schlecht dokumentiert. Die Determination erfolgte oft durch Molekularbiologen mit Hilfe von Bestimmungsschlüsseln. Entsprechende

Fehl- oder Falschbestimmungen konnten vorkommen. Die Probestiere wurden meist nicht in Zoologischen Sammlungen hinterlegt, um die Bestimmung im Nachhinein zu verifizieren. Oftmals wurden den Organismen nur Gewebeproben entnommen und sie wieder in die Freiheit entlassen, ohne zumindest eine Fotografie angefertigt zu haben. Auch die Fundortdaten konnten oft mangelhaft und nicht im Einklang mit den Richtlinien für die korrekte Bezeichnung von Sammlungstieren gewesen sein. Eben solche Fehler konnten mit der extrahierten DNA geschehen. Sie war den Organismen manchmal nicht mehr eindeutig zuzuordnen oder gar, besonders bei kleinen Probestieren, aus mehreren von ihnen gewonnen worden, die eventuell nicht einer einzigen Population angehörten.

Weitere Fehlerquellen mochte die Probenauswahl für phylogenetische Untersuchungen bergen. Fehlte vielleicht die systematische Expertise des Untersuchenden, beruhte die Probenauswahl oftmals auf gerade verfügbaren Individuen, und nicht auf phylogenetischen Einheiten. Dadurch wurden unvollständige Phylogramme errechnet, die zudem die wahren Verwandtschaftsbeziehungen der Taxa zueinander verzerrt darstellen konnten.

Wenn ökologisches Wissen über die zu untersuchende Gruppe fehlte, war auch eine *a posteriori* – Überprüfung der Ergebnisse auf ihre Plausibilität hin nicht möglich. Kryptische Arten waren übersehen, bivoltine Taxa und solche mit stark ausgeprägtem Dimorphismus nicht hinreichend berücksichtigt worden. Es bestand die Gefahr, die genetischen Unterschiede pauschal zu werten und biologische Artgrenzen nicht zu erkennen.

## **1.2 Lösungsansätze**

Diese Ausgangssituation war die Grundlage für Überlegungen, wie die klassische Taxonomie mit der Molekularen Phylogenetik verbunden werden könnte. Eine neue Form der Synthese zweier Disziplinen sollte erarbeitet werden, die den Erkenntnisgewinn deutlich steigert und die Taxonomie auf phylogenetisch-systematische Grundlagen bezieht. Es sollte eine neue Präzision in der Determination, Dokumentation und der genetischen Analyse unter Einbeziehung der biologischen Charakteristika der Untersuchungsobjekte und dem Nachvollziehen der abgeleiteten Erkenntnisse erreicht werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, anhand einer großangelegten Studie darzustellen, wie eine integrative Form der Systematik aussehen kann, wenn die als DNA-Taxonomie bezeichnete Definition von Populationen aufgrund ähnlichen Genotyps unter Beibehaltung des traditionellen Linné-schen Systems mit Erkenntnissen der Biologie, Ökologie und Phylo(geo)graphie verschmolzen werden.

Es wird in dieser, auf Insekten bezogene Fallstudie gezeigt, welches Potential in der integrativen Verwendung traditioneller Methoden und neuer Prozesse steckt, das Arteninventar mit einer neuen Präzision zu definieren. Es wird eine neue, nicht-invasive

Methode der DNA-Gewinnung vorgestellt, bei der die Gewebeteile, die bei der klassischen Genitalpräparation anfallen, zur Gewinnung der DNA verwendet werden.

Die DNA-Daten einer Dungfliegengattung werden beispielhaft einer Sensitivitätsanalyse unterzogen, um die taxonomische Auflösungsqualität verschiedener genetischer Marker und deren Auswerteverfahren gegeneinander zu testen. Dabei werden wichtige Erkenntnisse gewonnen, die auch bei anderen Gruppen Verwendung finden.

Die unterschiedlichen Aspekte der integrierten DNA-Taxonomie werden in der vorliegenden Dissertation anhand verschiedener Beispiele bei Fliegen, Käfern und Schmetterlingen untersucht, wozu wissenschaftliche Erstbeschreibungen, Re-Identifikationen, Phylogenien und Ökologische Anwendungen vorgenommen wurden.

## **2. Theoretische und methodologische Grundlagen**

### ***2.1 Die Historie der Molekularen Analysen***

Die Geschichte der Genetik beginnt vor knapp 150 Jahren, als Gregor Johann Mendel 1866 die Mendelsche Abstammungslehre veröffentlichte, und der Entdeckung der Struktur der DNA durch Watson & Crick 1953. Die Genetik entwickelte sich rasch weiter und fand im 20. Jahrhundert als molekulare Evolution Einzug in die Evolutionsforschung. Erst in den 1950er Jahren wurden immunologische Vergleiche für evolutionäre Fragestellungen verwendet, dann Protein-Elektrophorese und chromatographische Aminosäure-Auftrennungen. Eine Weiterentwicklung war die DNA-DNA – Hybridisierung. Seit den 1970er Jahren erlebte die DNA-Sequenzierung ihren Siegeszug. Durch die Entwicklung von statistischen Algorithmen konnten die erhaltenen Protein- und DNA-Sequenzen für phylogenetische Analysen verwendet und damit evolutive Verläufe nachgezeichnet werden.

Der Durchbruch für die breite Anwendung der DNA-Sequenzanalyse erfolgte 1977, als Sanger et al. die Methode der Sequenzierung mittels fluoreszenzmarkierter Dye-Terminatoren entwickelten und 1987 entsprechende DNA-Sequenzierautomaten auf den Markt kamen, und die Erfindung der Polymerase Kettenreaktion durch Karry B. Mullis 1983, mit der die Vervielfältigung von DNA im Labor möglich wurde (Saiki et al. 1985, 1988).

Die anfangs systematisch-phylogenetisch orientierten Arbeiten lieferten bahnbrechende Erkenntnisse, wie beispielsweise die Ergebnisse von Woese & Fox (1977), die mit 16S rRNA-Sequenzanalysen eine sehr alte Aufspaltung der Prokaryonten entdeckten und daraufhin diese Gruppe in Archaeobakterien und Eubakterien teilten. Später postulierten sie aufgrund dieser molekularen Ergebnisse die drei Ur-Reiche Bacteria, Archaea und Eukarya (Woese et al. 1990). Seitdem ist eine Vielzahl von phylogenetischen Untersuchungen



publiziert worden, die sich auch mit den Insekten befassen. Beispielhaft sei hier auf die Arbeiten von Friedrich & Tautz (1995) hingewiesen, die mit der Analyse der 28S rRNA die Großphylogenie der Insekten zeigen konnten und die Arbeit von Weller und Pashley (1995), die die Abstammung der Schmetterlinge ergründeten.

Innerhalb der Faunistik ergaben sich weitere Anwendungsgebiete der Molekularbiologie (RFLP, Mikrosatelliten, SSCP, RAPD; Übersicht bei Gerstmeier & Sedlmair 2004). Es zeichnete sich aber bald ab, dass die präzise systematische und taxonomische Determination der Untersuchungsobjekte eine unabdingbare Voraussetzung für die korrekte Stammbaumrekonstruktion ist, wie es auch die Auswahl der geeigneten Genabschnitte ist.

Bei Laufkäfern der Gattung *Carabus* beispielsweise erfolgten die ausgeklügelten genetischen Analysen auf Populationsebene, um die Untersuchungsergebnisse hinsichtlich Speziationsereignissen, Hybridisierungen und Populationsstrukturen in die Taxonomie einfließen zu lassen (Boge et al. 1994; Gerstmeier et al. 1998; Sedlmair et al. 2000) und damit die Phylogenie der höheren Taxa auf eine solide Basis zu stellen.

Ein Manko der meisten der phylogenetischen Untersuchungen war lange, dass die Autoren es versäumten, ihre Ergebnisse direkt in die Taxonomie einfließen zu lassen und die entsprechenden nomenklatorischen Änderungen zu vollziehen. Hewitt et al. lieferten dafür erst 1991 einen Leitfaden, in dem sie die Anwendung molekularer Techniken in der Taxonomie darstellten.

## **2.2 Die DNA-Taxonomie**

Der Begriff der DNA-Taxonomie wurde im Jahr 2002 von Tautz und Kollegen zunächst als Idee, dann in einem ausgearbeiteten Konzept der wissenschaftlichen Gemeinschaft vorgestellt (Tautz et al. 2002, 2003). Grundlage dafür war, dass das Wissen der traditionellen Taxonomen in demselben Maße verloren ging, wie es mit dem Aufleben der Biodiversitätsforschung vonnöten gewesen war. Es ging also zunächst um ein Nachwuchsproblem, dem eine immer größer werdende Nachfrage nach taxonomischer Expertise gegenüberstand. Dazu kam die von Lee (2002) festgestellte „Anarchie der Taxonomie“. Diese Kritik bezog sich auf die Tatsache, dass taxonomische Publikationen oftmals in schwer zugänglichen, kleineren, oft lokalen Organen erscheinen, die zudem teilweise den Grundsätzen der „guten wissenschaftlichen Praxis“ nicht genügen. Bis heute ist es eine Schwierigkeit für Alpha-Taxonomen, Art-Neubeschreibung in höherwertigen, internationalen wissenschaftlichen Journalen publizieren zu können, ohne gleichzeitig eine groß angelegte (phylogenetische, molekularbiologische etc.) Studie unternommen zu haben.

Das Konzept der DNA-Taxonomie von Tautz und Kollegen (2003) lautet wie folgt: „Von einem gesammelten Individuum wird eine Gewebeprobe entnommen und die DNA daraus extrahiert. Diese DNA dient als Referenzprobe, von der ein oder mehrere Genorte mittels PCR amplifiziert und sequenziert werden. Die resultierenden Sequenzen sind, in erster Näherung, ein Identifikationsmerkmal der Art, zu dem das entsprechende Individuum gehört. Diese Sequenz wird mittels geeigneter Datenbanken zusammen mit der Artbeschreibung und anderer entsprechender Information verfügbar gemacht. Die Sequenz dient nun, zusammen mit dem Typenexemplar und der zugehörigen DNA-Probe, die in Sammlungen hinterlegt werden, als ein Standard für zukünftige Überprüfungen. Sobald eine signifikante Sequenz-Datenbank aufgebaut wurde, können neue Sequenzen gegen die bereits existierenden geprüft werden, um Re-Identifikationen einer Art zu ermöglichen, oder um herauszufinden, ob eine Art-Neubeschreibung nötig ist. Diese Datenbank soll aber auch dazu dienen, die taxonomische Identität von Proben zu klären, die von Larvalstadien stammen, oder bei der Bestimmung von Artefakten dienen, bei denen Teile von gefährdeten Tieren verarbeitet wurden usw.“ (Tautz et al. 2003, Übers. d. Verf.).

Die DNA-Taxonomie stützt sich auf das bewährte Artnamensystem von Linné und ist in ihm verankert. Allein die Tatsache der Gattungsnamen-Änderungen z. B. bei Revisionen ist ein Manko, dem die DNA-Taxonomie mit der DNA-Sequenz als Referenz für eine Art begegnen möchte. Dabei ist der einmal vergebene Artnamen durch die Sequenz für immer auffindbar, und taxonomisch-systematische Erkenntnisse über die Eingruppierung der Art in höhere Taxa werden unter diesem Eintrag aufgeführt.

Konsequenterweise werden von Tautz et al. (2003) DNA-Sequenzen von jeder Art gefordert, insbesondere von neu zu beschreibenden Arten. Aber auch die Einbeziehung von bereits bekannten Arten wird ausführlich beschrieben, wobei gerade hier nochmals auf die wertvolle und unverzichtbare Expertise der Taxonomen und deren Mitwirkung an dem neuen System eingegangen wird. Hier sollen kleinere Anpassungen des Internationalen Codes der Zoologischen Nomenklatur (ICZN) erfolgen, die es ermöglichen, DNA-Neotypen zu designieren, aus denen die Referenzsequenz für bereits bekannte Arten erhoben werden kann, wenn dies aus dem original-Typus nicht mehr möglich ist.

Zoologische Sammlungen spielen eine zentrale Rolle in der Infrastruktur der DNA-Taxonomie. Hier sollen die Individuen aufbewahrt, die Gewebesammlungen kuriert und die DNA-Extraktionen und Sequenzierungen durchgeführt werden. Der Leihverkehr der Referenz-DNA wird dort ebenso abgewickelt, wie das tracking der Proben und die Wahrung der Interessen des Ursprungslandes, aus dem die Probe stammte, vor allem dann, wenn sich ein kommerzieller Wert einer Probe abzeichnet.

Über die zu verwendenden Genorte herrscht kein Zwang: Tautz und Kollegen wissen, dass verschiedene Genorte für unterschiedliche Fragestellungen ungleich gut geeignet sind.

Deshalb wird kein einzelnes Standard-Gen vorgeschlagen, sondern für die Evaluierung verschiedener Genorte plädiert, wobei insbesondere auf die Eignung der großen Untereinheit der ribosomalen DNA (rRNA, auch 28S rRNA genannt) eingegangen wird, da sie konservierte, flankierende Bereiche enthält, wo man in den meisten Fällen mit Standardprimern arbeiten kann, und hochvariable zentrale Bereiche enthält, die artgenaue Identifikationen ermöglichen. Auch ihre hohe Kopienzahl in den Zellen macht sie geeignet für Sequenzanalysen.

Dass die Referenzsequenzen in erster Linie als Identifikationsmerkmal dienen sollen, aber auch für phylogenetische Fragestellungen verwendet werden können, mindestens aber eine Anfangshypothese für phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse liefern können, stellen Tautz et al. (2003) heraus. Sie betonen aber auch, dass eine eigene Datenbank für die DNA-Taxonomie geschaffen werden muss, die sich deutlich von den in der damaligen Form existierenden Sequenzdatenbanken des EBI und NCBI unterscheidet. Dort wurden zu diesem Zeitpunkt nämlich keine taxonomischen Informationen und keine Überprüfungen der korrekten Artbestimmung der sequenzierten Proben durchgeführt. Mittlerweile wurde diesen Anforderungen Rechnung getragen und beispielsweise ein „Taxonomy-Browser“ implementiert, der mit den Sequenzeinträgen verbunden ist. Und bei neuen Sequenzeinträgen werden der Bestimmer der Art, von der die Sequenz stammt, und die Fundortdaten abgefragt.

Diese Infrastruktur aus Museum, Labor und Datenbank sollte von jedermann weltweit genutzt werden können, um günstig an Sequenzinformation zu gelangen, sei es durch eigene Einsendungen von Proben, oder durch Anforderung von Referenz-DNA-Aliquots, oder durch Abfrage von Informationen zu einer bestimmten Art, inklusive der DNA-Sequenz. Damit wäre die Taxonomie offener, freier zugänglich, und einer Qualitätskontrolle unterzogen.

Diese Vorstellung erfuhr teils zustimmende, teils strikt ablehnende Kommentare (Blaxter 2004, Lipscomb et al. 2003). Gerade die stark morphologisch orientierten Teilgebiete der Systematik und Taxonomie lehnten dieses Konzept ab, weil sie ihre Profession in Gefahr sahen und die Genetik als überbewertet betrachteten. Im weiteren Verlauf etablierte sich die DNA-Taxonomie dennoch immer weiter, wobei die vollumfängliche Umsetzung bis heute aber noch nicht erfolgt ist. Der zentrale Punkt hingegen, nämlich die Integration der DNA in Artbeschreibungen und Art-Identifizierungen gehört immer mehr zum Standard, bei dem die Beschreibung des Organismus nach seinem Äußeren beibehalten wird, die DNA aber zum wichtigsten Merkmalsatz für die Artdefinition erhoben ist. Damit wird zugleich die morphologische Charakterisierung einer Art einem Qualitätstest unterworfen, nämlich, wie präzise ein Taxon morphologisch von seinem Nächstverwandten verschieden ist. Im

Endeffekt ist damit eine zentrale Forderung Hennigs erfüllt, der das Prinzip der wechselseitigen Erhellung einführt (Hennig 1966). Damit ist gemeint, dass man sich im Erkenntnisprozess der Wissenschaft in den verschiedenen Disziplinen und Teilgebieten Einzelergebnisse erarbeitet, die im Zusammenspiel den größtmöglichen Erkenntnisgewinn liefern.

Abzugrenzen von der DNA-Taxonomie ist das DNA barcoding (Hebert et al. 2003a, b; 2005). Hierbei geht es darum, mittels eines kurzen DNA-Abschnitts, des „barcodes“, eine Art zu identifizieren. Der dazu verwendete Abschnitt liegt am 5'-Ende des mitochondrialen COI-Gens und ist 658 bp lang. Aller (zum Teil berechtigten) Kritik zum Trotz (Lipscomb et al. 2003, Sperling 2003a, Will & Rubinoff 2004, Meyer & Paulay 2005, DeSalle et al. 2005, Will et al. 2005, Brower 2006) wird das Barcoding-Verfahren, ausgehend von Hebert's Arbeitsgruppe in Guelph, Kanada, mittlerweile weltweit angewendet, um barcode-Inventare zu etablieren (FishBase, AllLeps, AllBirds etc.).

## **2.3 Der Artbegriff**

Eine zentrale Rolle spielt der Artbegriff. Dem **biologischen Artbegriff** (Mayr 1942) steht der **phylogenetische Artbegriff** gegenüber. Weitere Artbegriffe stellen oft nur Abwandlungen dieser beiden Konzepte dar und werden hier nicht weiter diskutiert. Die Definition des biologischen Artkonzepts lautet: „Eine Art ist eine Gruppe von natürlichen Populationen, die tatsächlich oder theoretisch miteinander kreuzbar und reproduktiv von anderen solchen Einheiten getrennt sind“ (Mayr 1942). Er grenzt davon den typologischen Artbegriff ab, bei dem eine Art durch einen Vertreter (Typus) einer Population definiert wird.

Das **biologische Artkonzept** erlaubt intraspezifische Einheiten, wie z.B. Unterarten (Mayr & Ashlock 1991). Sie bestehen aus ähnlichen lokalen Populationen einer Art, die zusammen ein Kontinuum bilden. Unterarten werden meist dann eingeführt, wenn es einen graduellen geographischen Wandel der phänotypischen Merkmale gibt. Sie sind geographisch getrennt (allopatrisch), aber zumindest theoretisch fertil kreuzbar (Mayr 1982). Die Errichtung von Unterarten ist demnach ein Weg, der unübersichtlichen Beschreibung einer Vielzahl von Arten, die sich nur minimal unterscheiden, zu begegnen (Cracraft 1983).

Das **phylogenetische Artkonzept** hingegen bezeichnet eine Art als „die kleinste erkennbare Gruppe von einzelnen Organismen, bei denen es ein Muster von Herkunft und Abstammung gibt“ (Cracraft 1983). Das bedeutet, dass phylogenetische Arten eine jeweils einzigartige Kombination von ancestralen und erworbenen Merkmalen besitzen. Ausgeschlossen sind dabei artspezifische Merkmale, die sich auf das Geschlecht, das Lebensstadium und änderbare Farberscheinung beziehen. Es gibt einen reproduktiven Zusammenhalt innerhalb

der Art, aber keinen Bezug zu reproduktiver Isolation zwischen den Arten. Bei diesem Artkonzept sind Unterarten nicht vorgesehen, sondern diese Taxa werden als Art betrachtet, wenn sie sich durch die Kombination von diagnostischen Merkmalen auszeichnen. Zugelassen wird aber auch hier eine gewisse Variationsbreite der Merkmale vor allem dann, wenn diese nicht artcharakteristisch sind. Beim phylogenetischen Artkonzept gelten allopatrische Populationen dann als Arten, wenn sie diagnostizierbar sind und man annehmen kann, dass sie gemeinsame Vorfahren hatten (siehe auch Brammer 2002).

Die Frage, wie morphologisch und biologisch unterscheidbare Arten auch genetisch unterschieden werden können, bearbeiteten beispielsweise Blaxter et al. (2006). Sie fanden eine Artgrenze bei ca. 2% Sequenzdivergenz im untersuchten COI-Gen bei Tardigrada in einer empirischen Studie. Theoretische Untersuchungen mit Crustaceen-Sequenzen aus GenBank von L  febure et al. (2006) hingegen postulierten eine weitaus gr  o  ere genetische Distanz zwischen den Arten (14%). Diese Ergebnisse wurden aber von Oliveira Biener et al. 2010 bezweifelt, da sie in einer empirischen Studie einer Borstenkrabben-Gattung weit geringere Werte fanden, die zudem mit konstanten morphologischen Merkmalen korrelierten.

Die wissenschaftliche Beschreibung einer Art ist in jedem Fall als Hypothese zu betrachten, die vor dem Hintergrund der o. g. Artdefinitionen verifiziert werden muss. Wird eine neue Art in der Wissenschaft als solche anerkannt, spricht man von einer validen Art. Der Artstatus kann angezweifelt werden, wenn sich die Abgrenzungsmerkmale nicht als konstant erweisen und mit der nächstverwandten Art ein Merkmalskontinuum hergestellt werden kann.

Da die Evolution ein fortlaufender Prozess ist, beobachtet man zu einem gegebenen Zeitpunkt eine Vielzahl von Zuständen der Speziation bei den verschiedenen Organismen der belebten Umwelt. Aufgabe der Taxonomie ist es, diese Organismen den verschiedenen phylogenetischen Einheiten auf ihrem korrekten Speziationsniveau zuzuordnen und sie zu benennen, um sie für Wissenschaft und Menschheit ansprechbar zu machen.

## ***2.4 Vorstellung der untersuchten Themenkomplexe***

Die Methoden der DNA-Extraktion waren seit jeher einer steten Entwicklung und Verfeinerung unterworfen. Wurden anfangs große Gewebeteile bestimmter Organe oder ganze Insekten für die Extraktion verwendet (Maniatis et al. 1982), kam man mit verfeinerten Methoden auch mit weniger Ausgangsmaterial aus. So wurden Methoden beschrieben, wie beispielsweise aus kleinen St  cken von Schmetterlingsfl  geln genügend DNA extrahiert werden konnte, um verschiedene nukleäre und mitochondriale Genabschnitte mittels PCR amplifizieren zu können (Rose et al. 1994). Mit dem Einzug der Sequenzanalyse in die

entomologische Forschung zur Aufklärung von Verwandtschaftsbeziehungen wurden die Museen als Reservoir potentieller Untersuchungskandidaten interessant, weil die Beschaffung frischen Materials oft mit großem Zeit- und Geldaufwand verbunden ist, oder die entsprechenden Taxa verschollen sind. Die Verwendung von Sammlungsmaterial zur Sequenzanalyse ist aber nicht trivial: Enzymatische Prozesse bewirken einen Zerfall der DNA, die Trocknung der Insekten war vielleicht nicht hinreichend schnell, oder sie wurden zur Präparation wieder aufgeweicht. Zu dem kommt die Tatsache, dass es nicht erwünscht ist, von Sammlungsmaterial Gewebeproben zu entnehmen und damit das Sammlungsobjekt zu beschädigen.

Im Themenkomplex „**DNA-Extraktion**“ wird eine neuartige Methode vorgestellt, die ein Ausweg aus diesem Dilemma ist. Ausgangspunkt ist die Verwendung der Gewebeteile, die bei der Mazeration des Abdomens anfallen, wenn ein morphologisches Genitalpräparat angefertigt wird. Wenn diese Mazeration enzymatisch, und nicht wie vorher mit Kalilauge durchgeführt wird, kann in einem Arbeitsschritt die DNA gewonnen UND ein morphologisches Dauerpräparat angefertigt werden. In der Veröffentlichung von Knölke, Erlacher, Hausmann, **Miller** & Segerer (2005) wird dieses neu entwickelte Verfahren vorgestellt und die Prozedur eingehend beschrieben.

Der Themenkomplex „**Analyseverfahren**“ behandelt ein weiteres, lange bekanntes Phänomen: Unterschiedliche Genabschnitte evolvieren unterschiedlich schnell. So müssen die für die jeweilige Fragestellung passenden Genabschnitte gefunden werden, welche die maximale Aussagekraft erlauben. Anhand eines Beispiels aus der Dipterenforschung (Laamanen, Meier, **Miller**, Hille & Wiegmann 2005) wird gezeigt, dass bei verschiedenen Analyseverfahren verschiedene Gene oder Abschnitte davon eine charakteristische Auflösungskraft in unterschiedlichen phylogenetischen Niveaus besitzen. Dazu wurde die Familie der Dungfliegen (Fam. Sepsidae) ausgewählt, um mit mehreren Markern eine Phylogeniehypothese zu erarbeiten. *A posteriori* konnte dann der Beitrag der einzelnen Genabschnitte zur Auflösung des Stammbaums berechnet werden. Es zeigte sich, dass das mitochondriale Gen der Cytochromoxidase (COI), hier der ersten Untereinheit, eine sehr gute Auflösungskraft bei den systematischen Niveaus Populations- bis Gattungsebene aufweist. Demgegenüber werden tiefere phylogenetische Verzweigungen auf Familienebene besser mit DNA-Sequenzen des Gens Elongation factor 1 $\alpha$  aufgelöst. Die Fragestellung entscheidet also über die Wahl des Genabschnittes, der verwendet werden soll.

Die Phylogenetische Auswertung der Sequenzdaten erfolgt gegenwärtig standardmäßig mit Parsimonie- und Likelihood-Verfahren. Letztere und Bayesianische Analysen erlauben, Sequenzspezifika in die Berechnungsalgorithmen zu integrieren um damit die Wahrscheinlichkeit des Ergebnisses der Stammbaumrekonstruktion zu erhöhen. Für

Artabgrenzungen ist hingegen die schiere Untersuchung auf Ähnlichkeit von zwei Sequenzen notwendig (s.u.). In der Morphologie findet, außer der strikten Gleichgewichtung aller Merkmale, auch eine Form der Sensitivitätsanalyse mit nachfolgender Individualgewichtung der Merkmale Anwendung. In der vorliegenden Untersuchung wird gezeigt, dass eine Sensitivitätsanalyse auch bei molekularen Datensätzen vorteilhaft ist und die Stabilität der erhaltenen Stammbaumrekonstruktion erhöht. Es ist sinnvoll, Sequenzen nicht von einem Computerprogramm alignen zu lassen, sondern dies manuell zu tun. Deletionen („Indels“) werden besser als fünftes Merkmal denn als fehlendes Merkmal behandelt (Hillis et al. 1996), und bei proteincodierenden Genen ist es besser, alle Positionen gleich zu behandeln, als die dritten Positionen abzuwerten (von Haeseler & Liebers 2003).

Themenkomplex „**Neuschreibungen**“: Arten werden in der Forschung erst greifbar, wenn sie wissenschaftlich beschrieben sind. Die Regeln, wie eine Neubeschreibung gestaltet werden muss, um als gültig anerkannt zu werden, sind im Internationalen Code für Zoologische Nomenklatur (ICZN) dargestellt. Grundlage ist das von Linné eingeführte, seit über 250 Jahren gültige System der binominalen Nomenklatur, also der Kombination von Gattungs- und Artnamen. Neue Arten müssen sich, um von anderen (bekannten) unterschieden werden zu können, von ihrem Nächstverwandten in mindestens einem konstanten Merkmal unterscheiden (Mayr 1969). Zur Zeit der Einführung dieses Systems standen den Taxonomen hauptsächlich morphologische Merkmalsätze als Charakterisierungsgrundlage von Artbeschreibungen zur Verfügung. Mit der DNA-Sequenzanalyse wurde ein neues Merkmalsset verfügbar, das sich anbot, ebenfalls als Charakterisierungseinheit in die Artdiagnose einbezogen zu werden.

Erste Anwendungsbeispiele bei Insekten waren Untersuchungen zu Artkomplexen und Zwillingarten, wie etwa von Kambhampati et al. 1996, die mitochondriale Sequenzabschnitte zur Diskriminierung von zwei Schwesterarten von Schaben verwandten und diese DNA-Sequenzen als Merkmale in die Artbeschreibung einbauten.

In eigenen Untersuchungen (Buchsbaum & Miller 2002, Speidel, Buchsbaum & Miller 2005) wurde nachgewiesen, dass neben der Morphologie auch die DNA-Sequenzen der als Referenzproben festgelegten Typenserie einer gewissen Variationsbreite unterliegen, die sinnvollerweise in der Erstbeschreibung definiert werden sollte. Dazu ist es nötig, von möglichst vielen der als Paratypen festgelegten Individuen DNA-Sequenzdaten zu erheben und sie auf Variationen zu untersuchen. Das Ergebnis ist, neben der DNA-Sequenz des Holotypus, eine Matrix mit variablen Positionen innerhalb der Typenserie, die (1) einen Einblick gibt in die Variationsbreite der neuen Art, und (2) die variablen Stellen deutlich werden lässt, die in dieser Art zu erwarten sind. Letzteres ist besonders dann von Interesse,

wenn die DNA-Sequenz als Identifizierungswerkzeug dienen soll, um falsch-negative Befunde auszuschließen.

Ein zusätzlicher, sehr wichtiger Aspekt ist die notwendige Einordnung der neuen Art in die bereits bekannten Arten einer Gattung nach dem Grundsatz: es gibt keine Taxonomie ohne Phylogenie. Mit den DNA-Sequenzdaten lassen sich phylogenetische Kladogramme errechnen, die die Einordnung und die Verwandtschaftsverhältnisse der neuen Art offenbaren (Hausmann, **Miller**, Leipnitz & Bläsius 2007). Dieses Verfahren kann im Umkehrschluss dazu verwendet werden, eine zusätzliche Abgrenzung einer neuen Art gegen bereits bekannte auch auf genetischer Ebene darzustellen.

Diese Art der Verwendung von DNA-Sequenzanalyse stellt eine Weiterentwicklung der ursprünglichen Idee der DNA-Taxonomie dar, die das binominale System durch reine DNA-Sequenzen ersetzen wollte, um diesen alle weiteren Merkmale der Art unterzuordnen. Dieses Verfahren hätte aber zur Folge, dass die Organismen zunächst keine Namen mehr benötigten, sondern über die schiere Abfolge der DNA-Sequenzbausteine A, T, C und G (Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin) definiert werden. Da es dem menschlichen Wesen aber mehr entspricht, der (belebten) Umwelt aussprechbare und einprägsame, auch bedeutungsvolle Namen zu geben, stieß dieser Ansatz auf Widerstände (z.B. Sites et al. 2003, s.o.). Daraufhin entwickelte sich die DNA-Taxonomie dahingehend weiter, das binominale System beizubehalten oder, wo noch keine Erstbeschreibung vorlag, Interimslösungen einzuführen, wie beispielsweise sog. OTUs (Operational Taxonomic Units), und die neuen Arten auf DNA-Sequenzebene demnach als MOTUs (Molecularly defined Operational Taxonomic Units, Blaxter et al. 2005) zu bezeichnen.

Eine besondere Stellung hat die DNA-Sequenzanalyse im Bereich der Abgrenzung von Arten gegeneinander und der Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse dieser Arten zueinander. Hierzu wurden im Themenkomplex „**Artabgrenzungen/Phylogenie**“ einige Arbeiten durchgeführt, wobei hauptsächlich Untersuchungen an Lepidoptera ausgewählt wurden.

Insbesondere bei den Pieriden der Gattungen *Euchloe*, *Elphinstonia* und *Anthocharis* konnten mittels DNA-Sequenzanalyse erstmals die bekannten Taxa molekular definiert und die Taxonomie aktualisiert werden. Dabei wurde die deutliche Verschiedenheit einer Artengruppe gefunden, die mit der Nominatform *Euchloe tagis* in die neu errichtete Gattung *Iberochloe* Back, Knebelsberger & **Miller**, 2008 überführt wurde.

Das grundsätzliche Problem bei auf Gattungsebene gut definierbaren Arten ist es, die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb dieser Gattung rein morphologisch aufzuklären. Mit der DNA-Sequenzanalyse ist es möglich, die genetischen Distanzen der Arten zu bestimmen und daraus einen Baum zu konstruieren, der diese Distanzen veranschaulicht (Back, Knebelsberger & **Miller** 2006a, b). In einigen Fällen, wenn diese Darstellungsform nicht aussagekräftig genug ist, bietet sich die Darstellung der genetischen Verhältnisse als



Netzwerk an (ten Hagen & **Miller** 2010), da hier die Beziehungen der Individuen zueinander als patristische Distanzen dargestellt werden und Querbeziehungen dargestellt werden können. Damit werden die genetischen Abstände und theoretische Zwischenschritte (d.h. Taxa, die nicht beprobt wurden oder nicht mehr existent sind) verdeutlicht, die die Taxa voneinander unterscheiden.

Aus den o.g. Untersuchungen konnte abgeleitet werden, dass es Abweichungen von der postulierten 2%-Regel gibt: Sperling legte 2003(b) fest, dass bei untersuchten Papilioniden der Gattung *Papilio* der genetische Unterschied zwischen den Arten bei etwa 2% liegt. Hebert et al. fanden 2004, dass die bislang einzige Art *Astrartes fuligator* in Wirklichkeit aus zehn Arten besteht und lösten dies mittels DNA-barcodes (einem Teilfragment des mitochondrialen COI-Gens) auf. Daraufhin fanden sie auch deutliche morphologische Unterschiede bei den Raupen der postulierten Arten. Bei den eigenen Arbeiten wurde deutlich, dass untersuchte Pieriden weitestgehend mit dieser 2%-Regel übereinstimmen, wobei für einige Arten dadurch deren Status erst untermauert wurde. Dahingegen scheint es sich bei Lycaeniden der Gattung *Callophrys* (ten Hagen & **Miller** 2010) anders zu verhalten: die 2%-Regel greift hier zu kurz und vermag es nicht, zuverlässig die bekannten Morphen, die auch phänologisch nicht leicht zu determinieren sind und für die verschiedene, auch ethologische Merkmale vorgeschlagen werden, voneinander zu trennen und sie zu identifizieren. Auf diesen Umstand hatten schon Wiemers & Fiedler 2007 hingewiesen, die daraufhin von einer „Barcoding-Lücke“ sprachen.

Bei all diesen Arbeiten war es essentiell, dass innerhalb einer Gattung alle rezenten Arten in die Analysen einbezogen wurden. Das verwendete mitochondriale Gen COI löst auf dieser systematischen Ebene die Distanzverhältnisse sehr gut auf, ist aber anfällig gegenüber phylogenetisch zu nahe stehenden paraphyletischen Aussengruppenvertretern. DNA-Sequenzen mittlerer Divergenz ( $p=0,05-0,10$ ) bergen die Gefahr, dass sie innerhalb der Innengruppe clustern und das eigentliche Gefüge zerstören.

Um diesen Effekt auszuschließen, ist mehr Sequenzinformation vonnöten. In der Studie über Schwimmkäfer der Gattung *Rhantus* (Balke, Ribera, **Miller**, Hendrich, Sagata, Posman, Vogler, & Meier 2009) wurden deshalb weitaus mehr Genorte untersucht, um die Verwandtschaftsverhältnisse in einer großangelegten phylogenetischen Analyse herauszuarbeiten. Diese Schwimmkäfergattung ist weltweit verbreitet, wobei der Ursprung bislang unklar war. Durch die Resultate konnte Neu Guinea als Entstehungsort der ancestralen *Rhantus*-Arten detektiert werden und davon ausgehend ein Besiedlungsszenario entwickelt werden, das die rezente weltweite Verbreitung der Arten der Gattung erklärt.

Themenkomplex „**Identifikationen**“: Die Erbsubstanz eines Organismus ist als Molekül unverändert in seiner Basenabfolge während der gesamten Lebenszeit und darüber hinaus

vorhanden. Diese Eigenschaft macht sie in besonderem Maße geeignet für die Identifikation eines Individuums bezüglich seiner Artzugehörigkeit. Gerade bei holometabolen Insekten, deren erste Stände im Habitus sehr stark vom Imago abweichen, ist die Artbestimmung ausschließlich auf morphologischer Basis in vielen Fällen nicht möglich, weil zum Beispiel kryptisch lebende Larven morphologisch kaum erfasst sind. Dies gilt ebenso für die Eier und Puppen, die oftmals noch weniger Unterscheidungsmerkmale aufweisen. Um Kenntnis der Juvenilstadien der Insekten zu erhalten ist es notwendig, Aufsammlungen durchzuführen und die Larven bis zum Imago zu pflegen, wobei jedes Larvenstadium zumindest photographisch dokumentiert wird. Auch die Zucht eingetragener Imagines kann weiteren Erkenntnisgewinn bringen, so sie gelingt und befruchtete Eier erhalten werden. Aber auch dann sind genaue Kenntnisse der Biologie notwendig, um den Larven das geeignete Substrat und Futter anzubieten. Diese Versuche gelingen bei einigen Insektengruppen regelmäßig, bei anderen sind sie schier aussichtslos. So lassen sich beispielsweise die natürlichen Habitatumstände eines Quellbachs im Aquarium nicht so naturgetreu darstellen, dass beispielsweise Steinfliegen (Plecoptera) oder Zuckmücken (Fam. Chironomidae) erfolgreich gezüchtet werden können.

In derartigen Fällen bietet sich die Bestimmung der Juvenilstadien mittels DNA-Sequenzierung an. Damit können in kurzer Zeit und ohne aufwendige Hälterungsvorrichtungen die gefundenen Präimaginalstadien einer Art zugeordnet werden, wobei natürlich als Maßstab die entsprechende DNA-Sequenz der eindeutig determinierten in Frage kommenden (adulten) Arten als Datenbank vorhanden sein muss. In eigenen Arbeiten wurde dies bei Libellen (Zygoptera) aus Peru erfolgreich durchgeführt (Etscher, **Miller**, & Burmeister 2006). Hierbei wurde die bislang unbekannte Larve der Art *Polythore spaeteri* eindeutig den Imagines zugeordnet und daraufhin morphologisch als erste innerhalb der Gattung beschrieben.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der DNA-Sequenzanalyse ist die Untersuchung von Schwesterarten. Die beiden Arten *Diachrysia tutti* und *D. chrysitis* sind Vertreter der Eulenfalter (Fam. Noctuidae), und gehören zum Verwandtschaftskreis der Messingeulen (Plusiinae). Diese weisen auf den Flügeloberseiten metallische Zeichnungselemente auf, die einer gewissen Variabilität unterliegen. Beim untersuchten Artenpaar gibt es zwei unterschiedliche Morphen, die in ihrer Variabilität Übergangsformen ausbilden. Es ist möglich, über spezifische Pheromonfallen diese beiden Arten, die früher teilweise synonymisiert wurden, anzulocken und zu fangen. Die Arbeitshypothese der Untersuchung (Hille, **Miller** & Erlacher 2005) war, dass sich diese unterschiedlichen Pheromotypen auch genetisch unterscheiden sollten. Um die Hypothese zu testen, wurden von verschiedenen Aufsammlungsorten Populationsstichproben genommen und die DNA der Individuen sequenziert. Es stellte sich heraus, dass die Pheromotypen eindeutig mit Haplotypenclustern

korrelieren. Die genetische Distanz der beiden Cluster ist zudem so groß, dass eindeutig von zwei verschiedenen Arten gesprochen werden kann, die nun aufgrund ihrer DNA eindeutig bestimmt werden können.

Eine weitere Untersuchung widmete sich den Schaben (Blattoptera). Bei den Ectobiinen der Gattung *Phyllodromica* gibt es eine Artengruppe, die hinsichtlich ihrer Fortpflanzungsstrategie heterogene Arten beinhaltet. Einige Arten pflanzen sich konventionell sexuell fort. Andere hingegen sind parthenogenetisch, wobei die Weibchen in ihren Ootheken unbefruchtete Eier absetzen (sie sind obligat thelytok), die sich wieder alle zu Weibchen entwickeln. Die Fragestellung war unter anderem, ob diese Biologie fakultativ gewechselt werden kann und beispielsweise mit biotischen oder abiotischen Faktoren zusammenhängt bzw. durch sie induziert wird, oder ob dieser Fortpflanzungsmechanismus obligat und unveränderlich ist und sich die unterschiedlichen Fortpflanzungstypen dadurch auch genetisch isoliert haben. Dazu wurden in einer weit gefassten Studie (Knebelsberger & **Miller** 2007) im Freiland der Iberischen Halbinsel Aufsammlungen durchgeführt und, wo möglich, die eingetragenen Larvalstadien bis zum (determinierbaren) Imago weiter gehalten. Umfangreiche morphologische Untersuchungen wurden mit DNA-Sequenzdaten komplettiert. Dabei stellte sich heraus, dass es tatsächlich eine genetische Barriere der verschiedenen Fortpflanzungstypen gibt und sie deutlich voneinander differenziert sind. Allerdings scheint dies eine relativ junge evolutive Entwicklung zu sein, weil die Sequenzunterschiede zum Teil noch keine hohen Werte aufweisen, was derzeit die Abgrenzung der gefundenen Morphen als eigenständige Arten nur in einigen Fällen rechtfertigt.

Nachdem nun die Anwendungsmöglichkeiten der DNA-basierten Systematik bei Insekten dargestellt wurden, ergeben sich weitere Anwendungsgebiete der DNA-Analyse, die Einblicke in die Ökologie der untersuchten Organismen gewähren. Beim Themenkomplex „**Ökologische Anwendungen**“ war es das Ziel, eingetragene Geometridenraupen nicht nur auf ihre Artzugehörigkeit genetisch zu bestimmen, sondern auch die Futterpflanze zu determinieren. Dazu wurden in einem ersten Versuch (**Miller**, Müller, Kravchenko, Junnila, Vernon, Matheson & Hausmann 2006) zunächst unbekannte Raupen untersucht, die im Jordantal an einer bestimmten Tamariskenart gefunden worden waren. Die Artbestimmung erfolgte mit Referenzsequenzen einiger an Tamarisken fressenden Geometriden-Arten, wobei die Raupen als *Chiasmia aestimaria* identifiziert wurden. Hierbei wurde die Trennschärfe der Determinationsqualität der DNA deutlich, aber auch die innerartliche Variabilität des untersuchten Genorts (COI) detektiert. Anschließend konnte auf DNA-Sequenzebene auch die Futterpflanzenart als *Tamarix nilotica* bestimmt werden. Dazu

wurde ein Fragment der Chloroplasten-DNA verwendet, das als *rbcL* bezeichnet wird und sich im Bereich der Botanik als Bestimmungsmarker bewährt hat (Kress et al. 2005).

In einer weiterführenden Studie (Matheson, Müller, Junnila, Vernon, Hausmann, **Miller**, Greenblatt & Schlein 2008) sollten die Möglichkeiten der Nahrungsbestimmung bei Insekten genauer untersucht werden. In Frage stand beispielsweise die Bestimmungspräzision des *rbcL*-Gens, aber auch, ob die Verweildauer des Nahrungsbreis im Darm die Determinationsqualität mittels PCR beeinflusst und ob die Größe des untersuchten Insekts eine Rolle spielt. Dazu wurden Blindversuche unternommen und Fütterungsversuche unter Laborbedingungen durchgeführt. PCR-Tests in Abhängigkeit von der Fraßzeit sollten die Degradierungsdynamik der DNA im Verdauungstrakt feststellen. Als erstes Resultat stellte sich erstaunlicherweise heraus, dass die untersuchten Pflanzen bis auf eine (*Vitis vinifera*) mit dem *rbcL*-Gen noch nicht in GenBank vorgehalten wurden. Das verdeutlicht die Notwendigkeit einer eigenständigen, lokalen DNA-Sequenz-Referenzdatenbank, um den Darminhalt der zu untersuchenden Insekten eindeutig einer Pflanzenart zuordnen zu können. Zum anderen spielte die Größe des untersuchten Insekts beim PCR-Test kaum eine Rolle: Das PCR-System ist so sensitiv, dass selbst kleine DNA-Mengen als Matrize ausreichen, um im Zuge der Kettenreaktion das Sättigungsniveau zu erreichen und eine maximale Amplifikatausbeute gewährleisten. Untersucht wurden Vertreter von acht Insektenfamilien. Weiters war es möglich, bis zu 12 Stunden nach der Nahrungsaufnahme noch DNA-haltigen Nahrungsbrei aus dem Insektendarm zu erhalten, der für den PCR-Test tauglich war.

Zusammenfassend lieferte diese Untersuchung mit einer Vielzahl von Einzelprojekten eindrucksvoll den Beweis, dass mittels DNA-Sequenzanalyse weit mehr über die Biologie der Insekten erforscht werden kann, als deren schiere taxonomische und systematische Identität, und dabei aktuell relevante Fragestellungen beantwortet werden können.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus dem zu untersuchenden Gewebe ist der erste von mehreren Arbeitsschritten im Labor, um zu DNA-Sequenzen zu kommen. In den meisten Fällen wurde von den getrockneten oder in hochprozentigem Alkohol aufbewahrten Individuen Gewebe entnommen, wobei Muskelgewebe aus dem Thorax bevorzugt wurde. Im Muskelgewebe liegen die Mitochondrien in hoher Anzahl vor, womit auch eine hohe Menge von Matrizen-DNA für Marker mitochondrialen Ursprungs vorhanden ist. Bei getrockneten Insekten wurden hauptsächlich einzelne Beine verwendet, die mittels eines Glaspistills trocken zerrieben wurden, um der Verdaulichkeit den Zugang zum Gewebe innerhalb der röhrenförmigen Chitinstruktur der Beine zu erleichtern. Versuche, die Effizienz des Zermahlungsprozesses zu steigern, indem sterile Glaskügelchen verschiedener Korngrößen zugegeben wurden, führten nicht zu einer erhöhten Ausbeute an Roh-DNA. Dies wohl auch deshalb, weil die Kügelchen selbst dabei mechanisch zerrieben wurden und bekannt ist, dass Glasstaub in der Lage ist, DNA-Moleküle zu binden (Sambrook & Russel 2001).

Für die weitere Prozessierung wurde der DNeasy Tissue Kit (später: Blood and Tissue Kit) der Fa. QIAGEN (Hilden) nach den Vorgaben des Handbuchs verwendet.

Für die besonderen Fälle beispielsweise wertvoller Typenexemplare einer Lepidopterenserie, die genitaliter untersucht werden sollten und von denen o.g. Gewebe nicht zu erhalten war, wurde ein Verfahren entwickelt, das die gleichzeitige Mazeration des Abdomens zur Freilegung der Genitalarmaturen für die Anfertigung von Dauerpräparaten, als auch der Gewinnung von DNA ermöglichte (Knölke, Erlacher, Hausmann, **Miller & Segerer** 2005). Dabei wurde wie folgt verfahren:

Das Abdomen der zu untersuchenden Trockenpräparate wird mit Hilfe einer über einer Flamme oder in Bleichlösung DNA-frei gemachten Pinzette vorsichtig vom Metathorax abgebrochen und in eine enzymatische Verdaulichkeit aus 20µl Proteinase K und 180µl Lysepuffer überführt. Die Chemikalien sind Bestandteil des Blood & Tissue DNA Extraction - Kits der Fa. QIAGEN. Die Inkubation erfolgt bei 56°C und kann bis zu 14 Stunden andauern. Zweckmäßigerweise verwendet man sterile 1,5ml Eppendorf-Safe-Lock – Gefäße, die entweder in einen programmierbaren Heizblock (Fa. Bioer) oder ein Wasserbad (Fa. Memmert) gestellt werden.

Da ein relativ großes Stück Gewebe, das noch dazu durch die Körperhaut wie eingekapselt vorliegt, zersetzt werden soll, ist ein erhöhter manueller Aufwand nötig. Man muss mittels einer sterilen Pipette immer wieder die Verdaulichkeit in das Objekt spritzen und das

Weichgewebe damit aus der Abdomenhöhle herauspülen, während das Abdomen im Röhrchen verbleibt. Dies muss aber so vorsichtig geschehen, dass die Genitalstrukturen nicht beschädigt werden. Im Falle der unvollständigen Zersetzung, beispielsweise bei gewebereichen Abdomina, wird weitere ProteinaseK zugefügt. Die für die nachfolgende Genitalpräparation notwendige Eröffnung des Abdomens kann schon während der Verdauphase durchgeführt werden und trägt dazu bei, die enzymatische Reaktion zu erleichtern und zu beschleunigen.

Ist die Lyse vollzogen, wird mit dem flüssigen Überstand wie vom Hersteller angegeben weiter die DNA-Extraktion prozessiert. Dazu werden zuerst 200µl AL-Puffer zugegeben und geschüttelt. Die Mischung wird dann für 10 min. auf 70°C erhitzt, um Enzyme zu inhibieren. Danach werden 200µl reines Ethanol zugegeben und die gesamte Flüssigkeit auf eine Extraktionssäule übertragen. Zentrifugations- und Waschschriffe der gebundenen DNA erfolgen nach Vorschrift, ebenso die Elution der DNA in frische Eppendorf-Gefäße (s.o.). Danach liegt die Roh-DNA im Elutionspuffer gelöst vor und wird weiter prozessiert.

Quantitäts- und Qualitätstests der resultierenden DNA wurden mittels Pico-Green-Färbung und Messung mit Fluorometer (VersaFluor, Fa. BioRad), sowie durch Amplifikationstests mittels PCR durchgeführt.

Die chitinösen Hartstrukturen werden in Wasser gewaschen und können direkt weiter präpariert werden. Eine Aufbewahrung vor der Präparation erfolgt in Glycerin oder 20%iger wässriger Ethanollösung. Für den Fall, dass die sklerotisierten Hartstrukturen noch zu steif für die Präparation sind, werden sie zusätzlich in Kalilauge gekocht.

Die nachfolgenden Laborschritte mit PCR, PCR-Kontrolle mittels Agarosegel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Anfärbung, der PCR-Produktaufreinigung, das Cycle Sequencing und der DNA-Sequenzierung mit dem ABI 377 DNA Sequencer ist in sämtlichen anhängenden Publikationen ausführlich beschrieben, worauf an dieser Stelle verwiesen wird.

Auch die Auswertung der Rohdaten bis hin zur Erzeugung der korrigierten und editierten Sequenzen ist dort beschrieben.

### **3.2 Analyseverfahren**

Die Datengrundlage für die Untersuchung der Sensitivitätsanalyse war ein Matrix aus DNA-Sequenzen von 12 Arten von Dungfliegen der Gattung *Themira* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Sepsidae) plus fünf Aussengruppenvertretern (Laamanen, Meier, **Miller**, Hille & Wiegmann 2005). Fünf verschiedene Gene wurden sequenziert: das nukleäre EF-1α – Gen

und die mitochondrialen Gene 12S rRNA, 16S rRNA, COI und COII, sowie ein Fragment upstream von COI mit variabler Länge in der angrenzenden tRNA. Die Matrizen wurden mit PAUP\* Version 4.0b10 (Swofford, 2002) mit der Parsimoniemethode analysiert (Heuristische Suche, zufällige Sequenzaddition, TBR branch swapping, 100 Wiederholungen). Um die Effekte von verschiedenen Indel-Bewertungen zu untersuchen, wurden die Indels der entweder manuell oder computergestützt alignierten Datensätze einmal als „Fünftes Merkmal“ und einmal als „Fehlendes Merkmal“ behandelt und die Datensätze unabhängig voneinander analysiert. Zusätzlich wurden 18 verschiedene Gewichtungparameter für Basensubstitutionen miteinander verglichen. So wurden „schnelle“ Transformationstypen wie Transitionen oder die 3. Basenpositionen abgewertet, indem ihnen das Gewicht „0“ zugewiesen wurde, oder den „langsameren“ Transformationen ein höheres Gewicht gegeben (2, 4, 6, 8 oder 10). Außerdem bekamen folgende Zustände ein höheres Gewicht: 1. alle Merkmale außer den dritten Positionen von proteincodierenden Genen; 2. alle Transversionen und Indels (wenn als „Fünftes Merkmal“ codierte Indels mindestens halb so stark gewichtet waren wie Transversionen, um die Verletzung der Dreiecks-Ungleichung (Wheeler, 1993) zu verhindern); 3. alle Transformationen außer den Transitionen der 3. Basenpositionen bei proteincodierenden Genen (Broughton et al. 2000). Demnach standen insgesamt 68 verschieden gewichtete und vier gleich gewichtete Analysesätze zur Auswertung.

Es wurden drei verschiedene Datensatzaufteilungsarten untersucht: Alle Gene gegeneinander, proteincodierende Gene gegen ribosomale Gene und nukleäre Gene gegen mitochondriale Gene. Die Merkmals-Inkongruenz wurde erhoben durch die Verwendung der incongruence length difference ILD ( $(Länge_{\text{kombiniert}} - \text{Summe der Länge}_{\text{Partitionen}}) / Länge_{\text{kombiniert}}$ ) (Mickevich & Farris 1981) und der rescaled incongruence length difference RILD (Wheeler & Hayashi, 1998). Die Unterstützung der Verzweigungen wurde mit Jackknife-Resampling (500 Wiederholungen mit jeweils 10 zufälligen Sequenzadditionen, 50% Deletion) erhoben. Die Zahl der Verzweigungen mit einem Jackknifewert von über 50 wurde gezählt und die Summe der einzelnen Jackknife-Unterstützungen des sparsamsten Baums wurde errechnet, wobei hier auch Werte von unter 50 Eingang fanden. Die Kongruenz der Topologien wurde für jedes Partitionsschema bestimmt durch: 1. Zählen der Anzahl von Verzweigungen des strikten Konsensbaums, 2. des halbstrikten Konsensusbaums und 3. der Berechnung des Wheelerschen (1999) taxonomischen RILD - Wertes. Bei den Partitionsschemata, die den Datensatz in zwei Teile teilten, berechneten wir auch 4. das Maß des Unterschieds symmetrischer Bäume (Penny & Hendy 1985) und 5. ein korrigiertes Maß des Unterschieds symmetrischer Bäume durch die Teilung durch die Anzahl der Verzweigungen, die nicht von Baum 1 und 2 geteilt wurden durch die Zahl der Verzweigungen der entsprechenden Bäume

mit der Addition dieser Summe zu der entsprechenden Zahl aus dem Vergleich von Baum 2 mit Baum 1.

Um den Beitrag der einzelnen Gene zu dem Bremer Support des Gesamtdatensatzes zu erheben, wurde eine geteilte Bremerunterstützungsanalyse (PBS; Baker & DeSalle 1997) mit den ausgewählten Analysekr Kriterien und einer veränderten Kommandozeile, die vom Programm AutoDecay (Version 5.0, Eriksson 2001) erhalten wurde, berechnet.

Zuletzt wurde noch das Verhältnis von ILD zu RILD zueinander berechnet, um herauszufinden, ob eventuelle Unterschiede dieser Indizes zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Dieselben Techniken wurden verwendet, um die Beziehung zwischen topologischer Kongruenz und der Merkmalsungleichheit zu bestimmen. Weil sich die Werte der topologischen Kongruenz unabhängig von der Auflösung des auf der Basis der Ergebnisse der einzelnen Partitionen zusammengesetzten Baums verhalten sollten, wurde anschließend zusätzlich auf einen Zusammenhang zwischen topologischen Kongruenzwerten und der Summe aller Verzweigungen der zusammengesetzten Bäume hin untersucht („Gesamtauflösung“).

### **3.3 Neubeschreibungen**

Die systematische Integration mindestens eines molekularen Merkmalssets in die wissenschaftliche Neubeschreibung von Arten war das Ziel einer Reihe von Arbeiten, die damit beispielhaft zeigen sollten, in welcher Form dies am zweckmäßigsten geschieht.

Bei Buchsbaum & **Miller** (2002) handelte es sich um die Neubeschreibung der Drepanidenart *Leucoblepsis taiwanensis*. Die Familie Drepanidae besteht aus mehr als 400 Arten weltweit, die Gattung *Leucoblepsis* Warren, 1922 ist auf die Orientalis beschränkt. Genauere Untersuchungen einer Aufsammlung von Individuen aus Taiwan zeigten die eindeutige Artverschiedenheit von der weitverbreiteten *L. excisa* (Hampson, [1883]). Für die Neubeschreibung standen neben dem Holotyp elf Paratypen für die Differentialdiagnose und zur Erhebung der molekularen Variationsbreite der neuen Art zur Verfügung.

Neben der üblichen morphologischen Beschreibung der artspezifischen Merkmale wie Zeichnung, Verlauf der Äderung, Position der schuppenfreien Fensterzonen auf den Flügeln, Abbildung und Beschreibung der männlichen und weiblichen Genitalien war die genetische Charakterisierung der *species nova* Bestandteil der Erstbeschreibung. Dazu wurden neben dem Holotyp fünf Paratypen verwendet, deren DNA nach der Methode von Knölke et al. (2005) extrahiert wurde. Zusätzlich wurde die einheimische Art *Drepana falcataria* (Linnaeus, 1758). als nahestehende Außengruppe untersucht. Die erhaltenen Sequenzen des COI-Gens wurde mit der homologen Sequenz des Seidenspinners *Bombyx mori* (Linnaeus,



1758). verglichen und die divergenten Basenpositionen erhoben. In einer zweiten Vergleichsmatrix wurde die innerartliche Variationsbreite des entsprechenden Markers berechnet und die Positionen der variierenden Basen aufgezeigt.

Eine weitere Neubeschreibung erfolgte bei den Pyraliden (Überfamilie Pyraloidea), sogenannten Kleinschmetterlingen. Hier war es eine Wasserzünsler-Art aus Lombok, Indonesien, die molekularbiologisch definiert wurde und deren COI-Sequenz wiederum Bestandteil der Erstbeschreibung von *Paracymoriza naumanniella* Buchsbaum, Speidel & **Miller**, 2004 war. Die Extraktion der DNA erfolgte nach der oben beschriebenen Methode (Knölke et al. 2005), PCR und Sequenzierung mit Standardprimern wie erwähnt. Die generierten Sequenzen wurden miteinander verglichen und die variablen Positionen gezählt und tabellarisch beschrieben.

Ein anderes Beispiel der integrierten Taxonomie ist die Erstbeschreibung von *Idaea nigra* Hausmann & Bläsius, 2007 (Lepidoptera: Geometridae). Hier sollte gezeigt werden, dass molekulare Datensätze in einer Erstbeschreibung auch dann Bestandteil sein können, wenn der für die molekularen Daten verantwortliche Wissenschaftler nicht Autor der neubeschriebenen Art sein soll, dennoch aber als Koautor der Arbeit erscheint, die die Erstbeschreibung beinhaltet (Hausmann, **Miller**, Leipnitz & Bläsius 2007). Auch hier war es das mitochondriale COI-Gen, das zur Artabgrenzung und zur groben Zuordnung der neuen Art zu bereits bestehenden Artengruppen innerhalb der Sterrhinae diente. Es wurden zwei der Paratypen molekularbiologisch untersucht und ihre genetischen Distanzen nach der Neighbor Joining-Methode berechnet. Die üblichen Beschreibungen der Morphologie der Falter und ihrer Genitalien wurde erweitert durch umfangreiches Fotomaterial der ersten Stände und Hinweisen zur Biologie der neuen Art.

Bei der letzten Neubeschreibung dieser Dissertation war das Ziel, nicht nur einen, sondern mehrere genetischen Marker in die Diagnose einzubeziehen. Bei **Miller** 2009 wurden dazu bei zwei neuen Arten der Gattung *Colias* Fabricius, 1807 (Lepidoptera: Pieridae) einerseits das mitochondriale COI-Gen als Standardmarker, aber auch die nukleären Gene Histone 3, Elongation Factor -1 $\alpha$  und die D2-Domäne des ribosomalen 28S-Gen sequenziert. Die DNA-Extraktion erfolgte mit Standardmethode, allerdings wurden einzelne Beine der beiden Holotypen verwendet. Zusätzlich wurde auch hier ein COI-Differential-Datensatz generiert, in dem bekannte Taxa mit identischem oder angrenzendem Verbreitungsgebiet beinhaltet waren. Die PCR erfolgte sowohl mit Standardprimern, als auch mit eigens für die Gattung *Colias* designten spezifischen Primern, da gerade beim hypervariablen COI-Gen die bekannten Allround-Primer oftmals versagen. Mutationen an den Primer-Bindungsstellen sind dafür verantwortlich. Das Primerdesign, welches bei vielen der vorliegenden Arbeiten angewendet werden musste, verläuft nach einem bestimmten Schema. Zuerst sucht man veröffentlichte homologe Genabschnitte möglichst nahverwandter Arten, die aligniert werden.

Dann fügt man diesem Datensatz selbst generierte DNA-Sequenzen hinzu, die von Proben des zu untersuchenden Taxons stammen. Meist befindet sich im Probensatz mindestens eine Probe, die hochwertige DNA liefert und mit der PCR-Amplifikate mit Standardprimern generiert werden können, die den gewünschten Zielbereich enthalten und von hinreichend weiteren Basenabfolgen up- und downstream flankiert werden. Danach lässt man sich die variablen Positionen dieses Datensatzes anzeigen (Befehl „Create Shadow -> Show Ambiguity Sequence“ bei SEQUENCE NAVIGATOR). Nun sucht man eine Stelle sowohl am 5'-, als auch am 3'-Ende der Zielsequenz, an der möglichst keine variablen Positionen auftreten und definiert diese als Primerbindungsstellen. Die aus diesen Genorten generierten spezifischen Primer sollen eine Länge von 20mer nicht unterschreiten, keine Haarnadel-Strukturen bilden, nicht komplementär sein (wodurch sie mit sich selbst hybridisieren würden), und eine ähnliche Schmelztemperatur aufweisen. Es sind verschiedene Computerprogramme verfügbar, die diese Arbeit erleichtern.

Die weiteren Labor-Arbeitsschritte bis zur Sequenzierung der fluoreszenzmarkierten PCR-Fragmente wie auch die Auswertung wurde oben schon hinlänglich beschrieben und hat sich als standardisierbare Methode bewährt. Die tabellarische Darstellung der genetischen Distanzen und der Abdruck der als Merkmale wichtigen DNA-Sequenzabfolgen ergänzten den molekularen Teil der Arbeit, bei der natürlich auch die morphologische Beschreibung der Holotypen und des *locus typicus* die integrale Vorgehensweise der Erstbeschreibung untermauerten.

### **3.4 Artabgrenzungen/Phylogenie**

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Anwendung der integrierten DNA-Taxonomie in bezug auf die Trennschärfe der Artidentifikation und der Anwendung der DNA-Daten bei der Phylogeniekonstruktion. Dazu wurde auf die Pieriden der Unterfamilie Pierinae der Untersuchungsschwerpunkt gelegt. Ein weiterer Schwerpunkt lag bei den Käfern der Gattung *Rhantus* Dejean, 1833 (Coleoptera: Dytiscidae) und ein anderer bei den Zipfelfaltern der Gattung *Callophrys* Billberg, 1820 (Lepidoptera: Lycaenidae).

Der erste Schwerpunkt lag auf der integrierten Analyse der Gattungen *Anthocharis* Boisduval, Rambour, Duméril & Graslin, 1833, *Elphinstonia* Klots, 1930, und *Euchloe* Hübner, [1819]. Die Auswahl der Taxa erfolgte bei der Gattung *Anthocharis* fokussiert auf die subspezifischen Taxa der *cardamines*-Gruppe (Back, Knebelsberger & **Miller** 2006a), wobei einige weitere Vertreter der Gattung einbezogen wurden. Die Arbeit über *Elphinstonia* (Back, Knebelsberger & **Miller** 2006b) war auf die eurasischen Taxa ausgerichtet, bei der Analyse der Gattung *Euchloe* waren einmal die paläarktischen und eurasischen Vertreter in der

Auswahl (Back, Knebelserger & **Miller** 2008), ein anderes Mal waren auch nearktische Vertreter inkludiert (Back, Opler & **Miller** 2011).

Die DNA-Extraktion erfolgte hier meist aus einzelnen Beinen der Individuen nach Standardmethode (s.u.), für die PCR wurden eigene Primer designt, die speziell für die entsprechenden Gattungen mit hoher Präzision Amplifikate lieferten (mtD7Pier\_kmbs-for: 5'-CGW ATA AAT AAT ATA AGW TTT TG-3' und mtD9Pier\_kmbs-rev: 5'-AAT GAW GTA TTA AGA TTA CGA T-3'). Die Analyse der Rohsequenzen erfolgte wie oben mit PAUP\* 4b10 nach der Neighbor Joining-Methode und den „uncorrected-p“-Verfahren. In der *Anthocharis*-Arbeit wurde die Netzwerk-Methode (Bandelt et al. 1999) verwendet, die in der Lage ist, Verwandtschaftsbeziehungen bei nahe verwandten Artengruppen noch deutlicher zu veranschaulichen, als es herkömmliche Kladogramme vermögen. Dabei werden die Substitutionsschritte von einer Sequenz zur nächsten als individuelle Transformationen dargestellt, die die „räumliche“ Distanz und die theoretischen, nicht besammelten (nicht mehr existenten?) Zwischenschritte abbilden. Zudem wurden in einigen dieser Arbeiten erstmals die genetischen Distanzen graphisch als Mittelwerte mit Konfidenzintervallen (Software PAST, Hammer et al. 2001) dargestellt. Phylogenetische Analysen erfolgten nach der Berechnung des auf die DNA-Sequenzen am besten passenden Substitutionsmodells mit dem Programm MODELTEST (Posada & Crandall 1998). Die Maximum Likelihood- und die Parsimonieanalyse erfolgte mit PAUP\*, die Bayesianische Analyse mit MRBAYES V. 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003).

Nach diesen intensiven Untersuchungen einer Unterfamilie der Weisslinge sollte die Übertragbarkeit der Methode und die damit zu erwartenden Ergebnisse hinsichtlich der Artauftrennungsschärfe und des phylogenetischen Gehalts dieser DNA-Sequenzen bei einer weiteren Lepidopteren-Familie geprüft werden. Dazu wurden die Zipfelfalter der Gattung *Callophrys* Billberg, 1820 ausgewählt, die zur Familie der Lycaenidae gehören (ten Hagen & **Miller** 2010). Die Methode ist nachfolgend stellvertretend für die meisten anderen Arbeiten ausführlich dargestellt:

Für die DNA-Extraktion wurden jeweils drei Beine der jeweiligen Proben, insgesamt 70 Falter von *Callophrys* s. str. und 7 Proben von Außengruppenvertretern verwendet. Die Beine wurden mit sterilen Glaspistillen in einem 1,5mL Eppendorf-Gefäß zerrieben und mit dem DNEasy Blood & Tissue Kit der Fa. QIAGEN (Hilden) nach deren Anweisungen behandelt. Die Vervielfältigung (PCR) des mitochondrialen Genfragments (COI) wurde mit den eigens für diese Untersuchung designten Primer kmbs-mtD6mod (5'-TAC CTA TTA TAA TTG GAG GAT TTG G-3') und kmbs-mtD9Lyc (5'-CAA AAA ATG AAG TAT TTA AAT TTC G-3') in einem BioRad Tprofessional Thermocycler mit folgenden Parametern durchgeführt: Anfangsdenaturierung 94°C für 5 Minuten, Annealing bei 48°C für 1 Minute,

Kettenverlängerungsreaktion bei 72°C für 1:30 Minute, Denaturierung bei 94°C für 1 Minute. Nach 50 dieser Zyklen erfolgte die letzte Kettenverlängerungsreaktion bei 72°C für 5 Minuten und Abkühlung auf 10°C. Die dafür verwendeten Reagenzien waren entweder das MBI Taq-System (recombinant) mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Puffer (MBI Fermentas, Leon-Rot) oder das BIOTAQ PCR Kit mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Puffer (Bioline, Luckenwalde) und Primer von metabion (Martinsried), mit 25µl Reaktionsvolumen, wobei 1µl DNA eingesetzt wurde. Die Amplifikate wurden mit dem MinElute PCR-Aufreinigungskit (QIAGEN) gereinigt und nach Konzentrationsmessung und -einstellung direkt sequenziert. Dazu wurde in einer zyklischen Sequenzierreaktion der BigDye Sequencing Dye Terminator Mix V 1.1 (Applied Biosystems) verwendet. Nach der Aufreinigung der Fragmente mit Sephadex (Fluka) wurde das Reaktionsgemisch auf einem ABI377XL Sequenzierautomat elektrophoretisch aufgetrennt. Aus beiden sequenzierten Einzelsträngen wurde jeweils eine korrigierte Konsensus-Sequenz erstellt.

Auswertung der Sequenzdaten:

Paarweise genetische Distanzen zwischen den einzelnen Taxa wurden mit der Software PAUP\* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony Version 4.0 β 10, Swofford 2003) berechnet. Aus den genetischen Distanzen der Taxa wurde ein Neighbour-Joining-Baum mit der Software PAUP\* konstruiert, der die genetischen Distanzen in Form eines Baumdiagramms abbildet. Zur Ermittlung der phylogenetischen Beziehungen zwischen den einzelnen Taxa und den Haplotypengruppen wurde eine Median Joining Network-Analyse mit dem Programm NETWORK V.4.5.10 (Bandelt et al. 1999) gerechnet, die mögliche alternative Evolutionspfade von DNA-Sequenzen einer rekombinationsfreien Population aufzeigt und die graphische Darstellung des Distanzcladogramms noch verfeinert.

Weitaus aufwendiger war die Vergleichsarbeit in einer anderen Athropodengruppe, nämlich der Coleoptera, hier Dytisciden der Gattung *Rhantus* Dejean, 1833 (Balke, ..., **Miller**, M. A., 2009). Diese Schwimmkäfer sind annähernd weltweit verbreitet und treten als Erstbesiedler in neu entstandenen (Klein-)Gewässern auf, wo sie räuberisch leben. Sie sind ca. 10mm groß und nie in größerer Anzahl an einem Fundort anzutreffen. Sie verlassen ihr Biotop schnell, sobald die Sukzession fortschreitet. Es war die *R. suturalis* – Artengruppe im Fokus, und die untersuchten Proben stammten aus Europa, Zentralasien, Indien, Japan, Wallacea, Melanesien, Australien und Neuseeland. Weitere Vertreter entstammten den Columbetini mit den Arten der Gruppe um *R. pacificus* und *Carabdytes upin* als Außengruppe. Es wurden pro Individuum mehr als 7.000bp alignierte DNA-Sequenzen erhoben, mit den nukleären Histon3 (322bp), wingless (352bp), Elongation Factor 1-α (1092bp mit zusätzlichen ca. 180bp Intron-Sequenz für eine Teilgruppe der Proben) und 18S rRNA Genen (602bp alignierte Sequenzen), und die mitochondriellen Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1-tRNA<sup>Leu</sup>-Cytochromoxidase c Untereinheit 2 (COI-COII, 2084bp aligniert), Cytochrom b-tRNA<sup>Ser</sup>-NAD

Untereinheit 1 (COB-NAD1, 1564bp alignierte bp), 16S rRNA-tRNA<sup>Leu</sup>-NADH Untereinheit 1 (16S rRNA-NADH1, 751 alignierte bp) und 12S rRNA (384 alignierte bp). Die Protein-codierenden waren längenkonstant, aber die tRNAs und rRNAs zeigten bis zu 11bp Längenunterschiede. Für das Alignieren der Sequenzen wurde die Software MUSCLE (Edgar 2004) verwendet. Von den alignierten 7.151bp waren 5.288bp konstant, 1.381bp waren Parsimonie-informativ. Die nukleären und mitochondrialen Genabschnitte wurden separat analysiert.

Die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen wurden mit Parsimoniemethode (PAUP\*) und partitionierten Bayesianischen (MRBAYES) Analysen berechnet. Bei letzterer wurde der Datensatz nach den enthaltenen Genen COI-COII, COB-NAD1 und 16SrRNA-NAD1 unterteilt separat analysiert. Für die Maximum Likelihood-Analysen wurde das Programm GARLI (Zwickl 2006) verwendet. Der Beitrag einzelner Marker wurde mit dem partitionierten Bremer Support berechnet, wobei die Indels als fünftes Merkmal gewertet wurden.

Das Alter von Auftrennungseignissen wurde mit dem Programm BEAST V. 1.4.7 (Drummond & Rambaut 2007) berechnet, wobei nur die mitochondrialen Gene verwendet wurden. Als Fixpunkt wurde die Aufspaltung von *R. intermedius* (Tahiti) und *R. schereri* (Bora Bora) + *R. debilis* (Tahiti) verwendet unter der Annahme, dass die beiden Arten *R. intermedius* und *R. debilis* auf Tahiti entstanden sind und *R. schereri* durch Dispersionsereignisse von dort aus vor einer Million Jahren Bora Bora besiedelte. Das Alter von Tahiti wird auf 0,4-1,2 Millionen Jahre geschätzt. Es kam eine durchschnittliche Substitutionsrate von 0,019 Substitutionen pro Stelle und einer Million Jahre heraus, mit einem 95%-Konfidenzintervall zwischen 0,011 und 0,028. Dieses Ergebnis stimmt mit der weithin angenommenen Substitutionsrate von 0,0115 pro Stelle und einer Million Jahren überein, die für Insekten-mtDNA berechnet wurde (Brower 1994).

Für die biogeographischen Untersuchungen wurde das Programm DIVA (Ronquist 1996) verwendet, und zusätzlich ein parsimonisches Merkmals-Mapping mit MACCLADE (Maddison & Maddison 1998) durchgeführt. Dafür wurden folgende biogeographische Einheiten definiert: Orientalis, Holarktis, Australien (mit Neuseeland und Neucaledonien), Sundaland/Wallacea (die Übergangszone von Orientalis und Australien), Neu Guinea und Ost-Melanesien mit Polynesien.

### **3.5 Identifikationen**

Die Bestimmung von Organismen und damit die Zuordnung zu bereits bekannten Arten oder noch unbeschriebenen Spezies ist die herausragende Tätigkeit von Systematikern und

Taxonomen. Die dazu verwendeten Bestimmungsschlüssel basieren auf morphologischen Merkmalsätzen und werden langsam ergänzt durch molekulare Identifikationsmarker. Grundlage gerade bei der molekularen Artabgrenzung sind u. a. die in Kap. 3.4 vorgestellten spezifischen Maßeinheiten der genetischen Artdivergenz. Das bereits erwähnte mitochondriale COI-Gen ist hierbei mittlerweile das meistverwendete, aber auch 16S rDNA oder das nukleäre 28S rRNA-Gen werden häufig verwendet, um einen weiteren Merkmalsatz zu generieren, aber auch, um dieses Verfahren in der Routinebestimmung anwenden zu können. Es bedarf aber für eine zuverlässige Bestimmungsqualität einer umfassenden Datenbank, auf die eine Software zum Abgleich der Abfrage mit bereits gespeicherten Sequenzdaten zurückgreifen kann. Ist dieser backbone einmal vorhanden, können Routinebestimmungen automatisiert durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit soll an drei Beispielen gezeigt werden, dass diese Methode der Bestimmung durchaus zielführend sein kann und manchmal, bei schwierigen morphologischen Verhältnissen, sogar einen Erkenntnis fördernden Mehrgewinn erbringen kann.

Im ersten Beispiel (Hille, **Miller** & Erlacher 2005) geht es um die schwierige Unterscheidung von zwei nahe verwandten Arten von Messingeulen (Lepidoptera: Noctuidae, Plusiinae, *Diachrysia* Hübner, [1821]). Sie zeichnen sich durch einen metallischen Glanz in Form von unregelmäßigen Flecken auf den Vorderflügeln aus, die zwischen den Arten Übergangsformen bilden. In den meisten Fällen kommen die beiden Arten synchron und syntop vor. Eine sichere Determination wird dadurch erschwert. Priesner (1985) fand heraus, dass zwei verschiedene *Diachrysia*-Populationen von zwei verschiedenen Sexuallockstoffen angezogen wurden: einmal dem (Z)-5-decenyl-Acetat und dem (Z)-7-decenyl-Acetat. Diese beiden Lockstoffe wurden synthetisch hergestellt und in Fallen verwendet, um männliche Eulenfalter anzulocken. Diese wurden molekularbiologisch wie oben beschrieben untersucht, wobei auch hier das COI-Gen analysiert wurde. Die Auswertung erfolgte mittels Distanzanalyse.

Das zweite Beispiel bezieht sich auf die Zuordnung von Präimaginalstadien zu den zugehörigen Imagines, um eine Determination der Spezies durchzuführen. In der Arbeit von Etscher, **Miller** & Burmeister (2006) war es die Prachtlibellenart *Polythore spaeteri* Burmeister & Börzsöny, 2003, die in Peru im Amazonastiefland vorkommt. Larven einer Prachtlibellenart wurden in schnell fließenden Urwaldbächen unter größeren Steinen klammernd gefunden. Ihre Zugehörigkeit zur oben genannten Art war wahrscheinlich, jedoch nicht gesichert. Aufzuchtversuche waren wegen des hohen Sauerstoffbedarfes der Larven nicht möglich, deshalb wurde anstatt dessen die Zuordnung mit molekularen Methoden durchgeführt. Die DNA-Extraktion, die PCR und die Sequenzierung erfolgten wie oben erwähnt, die Auswertung wurde mittels Distanzanalyse durchgeführt.

Das dritte Beispiel ist die umfassende Aufarbeitung einer Artengruppe innerhalb der Schaben. Bei Knebelsberger & **Miller** (2007) ging es um die morphologische und molekulare Untersuchung der Artengruppe um *Phyllodromica subaptera* (Rambour, 1838) (Blattoptera: Blattellidae, Ectobiinae, *Phyllodromica* Fieber, 1853), einer mediterran verbreiteten Schabenart mit dem Verbreitungsschwerpunkt Iberische Halbinsel. Dort kommt eine bisexuelle Form vor, wohingegen im Rest des Verbreitungsgebietes parthenogenetische Weibchen die Artengruppe repräsentieren. Die Proben wurden im gesamten Verbreitungsgebiet in unterschiedlicher Dichte gesammelt, wobei auch einige Inselpopulationen berücksichtigt wurden. Untersucht wurde licht- und rasterelektronenmikroskopisch mit den entsprechenden präparativen Vorarbeiten, und molekulargenetisch mittels Analyse des mitochondrialen COI-Gens. Die Auswertung erfolgte kladistisch mit dem morphologischen Merkmalssatz nach der Maximum Parsimonie (MP)-Methode. Die DNA-Sequenzdaten wurden ebenfalls mit MP, aber auch mit Maximum Likelihood (ML) und Bayesianischer Analyse ausgewertet, um eine Phylogenie zu erstellen. Die genauen Parameter und Einstellungen sind in der Publikation ersichtlich.

### **3.6 Ökologische Anwendungen**

Die vorstehenden Aspekte bezogen sich auf die grundlegenden Techniken und Verfahren der integrierten DNA-Taxonomie. Ein weiterer Teilaspekt sei im nachfolgenden Kapitel kurz angerissen. Hierbei geht es um die Möglichkeiten der praktischen Anwendungen der Ergebnisse und Ergebnisse der DNA-Taxonomie, beispielsweise in der Ökologie. Der Fokus lag in den Arbeiten von **Miller** et al. (2006) und Matheson, ..., **Miller**, ... (2008) auf der genetischen Untersuchung vom Darminhalt (1) von Geometridenlarven als Pilotprojekt, und (2) von einer breiten Auswahl von Insekten als weiterführende Studie.

Bei der Analyse von israelischen Geometridenlarven (**Miller** et al. 2006) stand die Identifizierung der Spezies einerseits, aber auch die Detektion der Nahrungspflanze im Vordergrund. Dazu wurden die sechs in Alkohol aufbewahrten Raupen aus dem Jordantal mit sterilen Uhrmacherpinzetten und Mikroscheren eröffnet, Muskelgewebe entnommen und Darminhalt separiert. Das Gewebe wurde wie oben beschrieben behandelt, die DNA extrahiert und mittels PCR das COI-Gen vervielfältigt und sequenziert. Referenztiere waren zwei Arten der Gattung *Chiasma* Hübner, [1823] (*C. aestimaria* und *C. syriacaria*) und zwei Arten der Gattung *Eupithecia* Curtis, 1825 (*E. ultimaria* und *E. opistographata*). Diese Arten wurden aufgrund ihrer bekannten Verbreitung im Aufsamlungsgebiet der Larven, aber auch aufgrund ihrer Fraßpflanze ausgewählt. Die Raupen waren alle an einer Tamariskenart

aufgesammelt worden. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit Ähnlichkeitsuntersuchungen und einer Distanzanalyse (UPGMA in PAUP\*).

Die abschließende Untersuchung zu dieser Fragestellung widmete sich der Identifikation von Nahrungspflanzen mittels PCR-Test des Darminhalts (Matheson, Müller, Junnila, Vernon, Hausmann, **Miller**, Greenblatt & Schlein 2008). Dazu wurden gezielt pflanzenfressende Insekten gesammelt und mitsamt ihrer Futterpflanzen im Labor weitergezüchtet. Als Referenz dienten Grillen (*Gryllodes hebraeus*), bei denen untersucht wurde, wie lange sich der Darminhalt nach dem Fraßvorgang noch genetisch detektieren lässt. Das untersuchte Gen war das Ribulose-Bisphosphat Carboxylase - Gen (große Untereinheit, *rbcl*) der Chloroplasten. Ein Fragment von 157bp Länge wurde ausgewählt, da dieses kurze Teilstück auch bei durch den Verdauungsprozess sehr degradierter DNA amplifizierbar ist. Die resultierenden DNA-Sequenzen wurden mit einer BLAST-Suche mit den in GenBank gespeicherten Sequenzen verglichen und die Zuordnung evaluiert.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 DNA-Extraktion

Die oben beschriebene Methode der DNA-Extraktion aus Abdomina (Knölke, Erlacher, Hausmann, **Miller**, & Segerer 2005), führte bei 74 von 81 untersuchten Proben zu einer erfolgreichen DNA-Extraktion mit einem DNA-Gehalt von mindestens 200ng. Generell zeigten sich frischere Proben als besser geeignet als ältere, was mit der Degenerierung der DNA durch enzymatische Prozesse im Abdomen bei vorhandener Restfeuchte zu erklären ist. Deshalb ist es wichtig, die Historie der zu beprobenden Sammlungstiere zu kennen, um nachfolgend im Labor die Arbeitsabläufe effizient zu gestalten. Wiederaufgeweichte Exemplare oder solche mit schimmigen oder verölten Abdomina sind kaum geeignet, hinreichende DNA daraus zu gewinnen. Drei der Proben waren über Tage in der Aufweischachtel gelegen, um die Falter zu relaxieren und nach dem Aufweichen spannen zu können. Die daraus extrahierte DNA versagte beim PCR-Qualitätstest. Hingegen waren solche Proben hervorragend tauglich, die entweder permanent trocken gehalten wurden, oder solche, die nach der Tötung des Falters sofort in Ethanol überführt und darin weiter aufbewahrt wurden.

Die DNA aller dieser Proben wurde einem Qualitätstest unterzogen, indem PCR mit verschiedenen Primerkombinationen, die verschieden lange Fragmente amplifizieren, durchgeführt wurden. Dabei wurden von 2/3 aller Proben Fragmente mit mindestens 300bp Länge generiert, von ca. 50% der Proben solche mit mehr als 800bp Länge. Eine



anschließende Sequenzierung einer Auswahl der Fragmente bewies die Integrität der DNA und die Brauchbarkeit der PCR-Amplifikate für diesen Zweck.

Aufbewahrung der Proben	Probenanzahl gesamt	Anzahl der Proben mit mind. 200ng DNA	Anzahl der Proben mit mindestens 300bp PCR-Produkt	Maximal erreichbare Fragmentlänge in der PCR
in Alkohol	4	4	4	831bp
nur getrocknet	39	39	36	831bp
gespannt, evtl. vor Präparation aufgeweicht	35	30	15	418bp
mind. 2 Tage vor der Präparation in Aufweichbox	3	1	0	0
<b>Summe</b>	<b>81</b>	<b>74</b>	<b>55</b>	

**Abbildung 1: Abhängigkeit des PCR-Erfolgs vor der Probenhistorie**

Übersicht über die untersuchten Präparate, bei denen die Abdomenmazerations-Methode angewendet wurde. Von insgesamt 81 Proben wurde bei 74 eine DNA-Menge von mindestens 200ng erzielt. Die Qualitätskontrolle mittels PCR erbrachte bei 55 Proben eine Fragmentlänge von mindestens 300 Basenpaaren. Die maximale Fragmentlänge von 831 bp des COI-Gens wurde bei stets trocken gehaltenen Tieren sowie Proben, die in reinem, unvergälltem Alkohol aufbewahrt wurden erreicht. **Aus:** Knölke, S., Erlacher, S., Hausmann, A., **Miller, M.A.** & Seegerer, A.H. (2005): A procedure for combined genitalia dissection and DNA extraction in Lepidoptera. *Insect Systematics & Evolution* 35: 401-409, verändert.

Bei späteren Präparationen größerer Serien mit dieser Methode stellte sich die Überlegenheit der neuen Technik eindrucksvoll dar. Selbst ältere Sammlungstiere lieferten dabei große Mengen an DNA, die zwar degradiert war. Wenn aber die PCR-Protokolle angepasst wurden, und beispielsweise nur kurze Fragmente amplifiziert wurden, war auch diese DNA aus historischem Gewebe durchaus brauchbar.

Ein weiterer Nebeneffekt ist, dass in einigen Fällen sogar die Eier in weiblichen Abdomina erhalten wurden, die, nach Verfeinerung der Technik, rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden konnten (Junker et al. 2006) und Daten zur Struktur des Chorions und der Mikropyle lieferten.

## 4.2 Analyseverfahren

Für die Berechnungen der DNA-Sequenzen der Dungfliegen der Gattung *Themira* stellte sich heraus, dass zwei der Proben so große Lücken in den erhaltenen DNA-Sequenzen aufwiesen, dass die Stabilität der Berechnungen negativ beeinflusst wurde (Laamanen, Meier, **Miller**,

Hille & Wiegmann 2005). Deshalb wurden sie aus den einzelnen Analyseverfahren ausgeschlossen.

Aufgrund der Resultate der Kongruenzuntersuchungen und der Jackknife-Unterstützung war die manuelle Alignierung der Sequenzen der computergestützten mit vorgegebenen Einstellungen weit überlegen. Für beide Alignierungsverfahren verringerte sich der Wert, wenn die Indels als fehlende Merkmale gewertet wurden, und nicht als fünftes Merkmal. Die Merkmalsinkongruenz nahm beim manuellen Alignierungsverfahren jedoch stärker ab. Auch die Werte der ILD und RILD-Berechnungen waren, bis auf zwei Ausnahmen, bei den Analysen, die die Indels als fünftes Merkmal werteten, am geringsten, und stachen damit die Bewertung der Indels als fehlendes Merkmal ebenso aus.

Das Abwerten der 3. Basenpositionen führte nie zu hohen Jackknife-Werten, erhöhte dagegen aber den Merkmalskonflikt (ILD, RILD). Wurde dagegen das Gewicht der Transversionen erhöht, führte dies zu allgemein besserer Baumunterstützung und verringerten ILD-Werten. Insgesamt war die Gewichtung der Transversionen mit den Werten 2 oder 4 bevorzugt bezüglich der Kongruenz und der Verzweigungsunterstützung, wohingegen das alleinige Aufwerten der Transversionen an den 3. Positionen keine Verbesserung der Kongruenz und Verzweigungsunterstützung brachte.

Der Beitrag der einzelnen Gene wurde mit den Bremer-Unterstützungswerten gemessen. Bei den bevorzugten Analyseparametern (manuelles Alignment, Transversionengewichtung 2, Indels werden als fünftes Merkmal gewichtet) wurde berechnet, dass mehr als die Hälfte der phylogenetisch informativen Basenpositionen und der Gesamtunterstützung des Datensatzes allein vom locus COI herrührt. Deshalb wurden von jedem einzelnen Gen phylogenetische Analysen berechnet. Der Baum der einzelnen Gene war identisch mit dem Baum des kombinierten Datensatzes. Allerdings weist der Baum, der sich aus allen nicht-COI-Genen erzeugt wurde, eine annähernd identische Topologie wie der COI-Baum auf. Insgesamt gesehen zeigten die PBS-Werte einen gegenüber dem nukleären Gen EF-1 $\alpha$  erhöhten Beitrag zu den Verzweigungsunterstützungen von den mitochondrialen Genen, das sogar einen negativen Beitrag lieferte.

Die Grundlage der Korrelationsanalysen ist die Tatsache, dass ILD und RILD eng verbunden sind. Die Verhältnisse zwischen der Gesamtauflösung und den topologischen Kongruenzwerten sind: 1. geteilte Verzweigungen bei strikten Konsensberechnungen:  $r=0,551$ ; 2. bei semistriktem Konsensus:  $r=-0,284$ ; 3. taxonomischer RILD:  $r=-0,291$ ; 4. Maß der Unterschiede symmetrischer Bäume:  $r=-0,301$ . Das Verhältnis zwischen der topologischen Kongruenzmassen und ihre Korrelation mit der Merkmalsinkongruenz reicht von moderat bis stark.

Bei dieser sehr umfangreichen Sensitivitätsanalyse mit 18 verschiedenen Gewichtungsregimen bei zwei verschiedenen Alignmentmethoden und drei verschiedenen

Versionen der Aufteilung des Datensatzes wurden zusätzlich verschiedene Kriterien verwendet, um die besten Analyseparameter herauszufinden, wie topologische Kongruenz, Merkmalsinkongruenz und phylogenetisches Signal. Es hätten also viele verschiedene Analyseparameter favorisiert werden können. Es zeigte sich aber, dass in 90% der Fällen die optimalen Werte bei vier verschiedenen Gewichtungsregimen gefunden wurden, die alle das Abwerten der Transitionen ( $t_i=0$ ,  $t_v=2, 4$  oder  $6$ ) beinhalten. Bei der Behandlung der Indels könnte man davon ausgehen, dass eine Eliminierung derselben, also das Behandeln als fehlendes Merkmal, das Rauschen im Datensatz verringern könnte. Es zeigte sich aber genau das Gegenteil: die Signale wurden klarer, wenn den Indels ein fünfter Merkmalszustand zugewiesen wurde, und die Unterstützungswerte verbesserten sich.

Transitionen und dritte Basenpositionen von proteinkodierenden Genen evolvieren schneller und sind deshalb eher im Sättigungsbereich als erste und zweite Kodonpositionen und Transversionen (Broughton et al. 2000; Wakeley 1996). Aufgrund dieser theoretischen Überlegungen haben manche Autoren vorgeschlagen, dass dritte Kodonpositionen und Transitionen mindestens abgewertet, aber auch ganz von phylogenetischen Analysen ausgeschlossen werden sollten (Swofford et al. 1996, Wenzel & Siddall 1999). Bei empirischen Test jedoch wurde gefunden, dass sie nicht nur bei jungen Taxa und Verzweigungen zu verwenden sind (Cho et al. 1995; Allard et al. 1999; Wenzel & Siddall 1999; Sennblad & Bremer 2000), sondern auch bei eher alten Gruppen wie den Säugetieren lieferten sie eine gute Unterstützung bei den Analysen. Selbst bei Analysen, in denen paarweise Distanzplots eine Sättigung aufzeigten (z. B. Yoder et al. 1996), waren die dritten Positionen wertvoll. Auch in der vorliegenden Arbeit wird der Wert der dritten Positionen bestätigt. Zudem verringert sich die phylogenetische Aussagekraft dramatisch, wenn die dritten Positionen unberücksichtigt werden, was sich bei der Analyse der Jackknife-Unterstützung deutlich zeigt. Sollten die dritten Positionen also nur Rauschen erzeugen, würde man kaum erwarten, dass sie eine Art hierarchische Struktur generieren, die hohe Verzweigungsunterstützung hervorruft.

Bei den Transitionen zeigte sich, dass ein gemäßigt Abwerten besser ist als ein radikales, da auch sie ein beachtenswertes phylogenetisches Signal beinhalten. Eine Gewichtung der Transversionen mit 2 oder 4 erwies sich hier als am besten geeignet, die höchsten Unterstützungswerte aus dem gegebenen Datensatz zu erhalten.

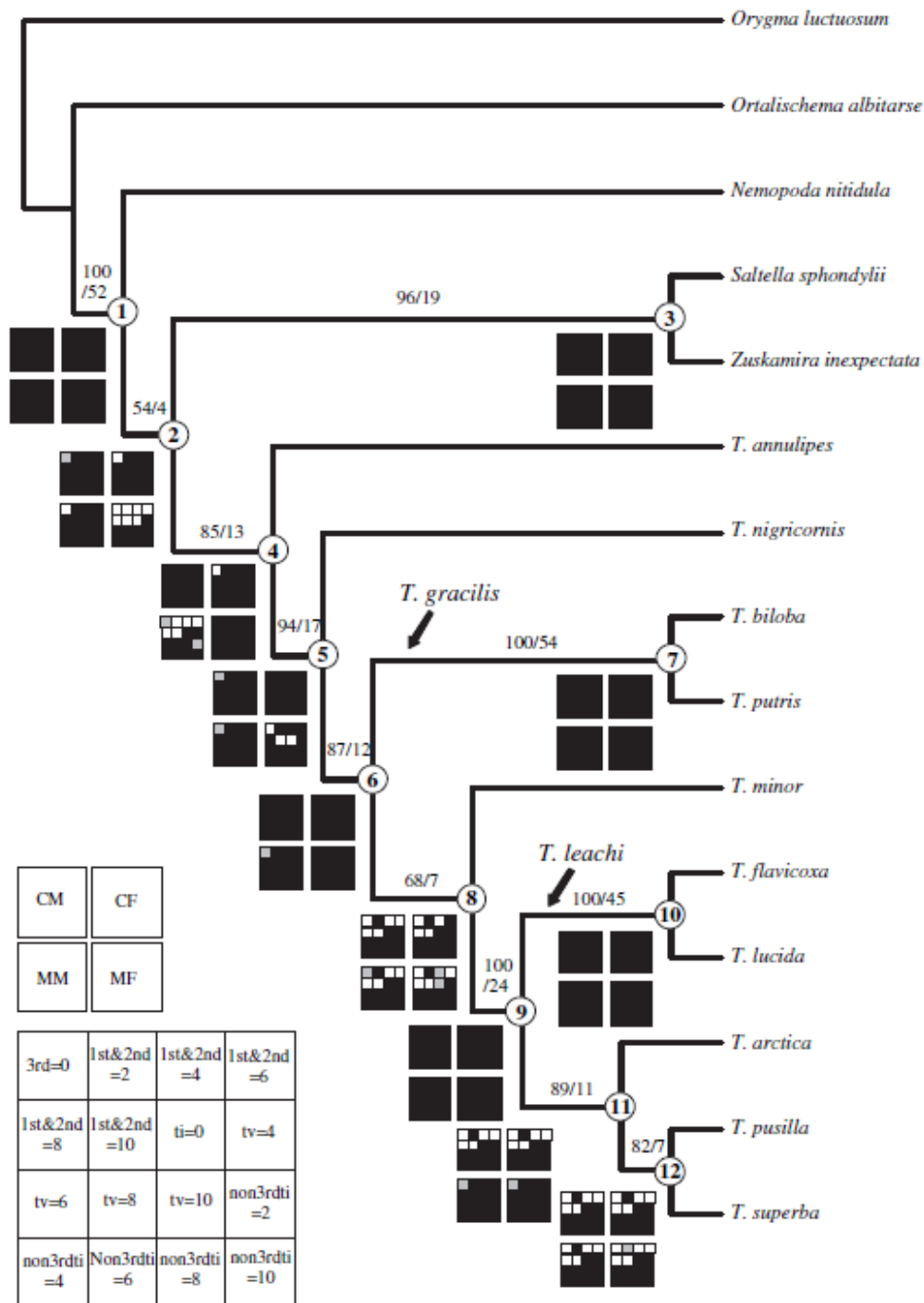
Zum Alignment gibt es eine Vielzahl von Kommentaren und die wiederholbare, objektive Methode des computerisierten Alignens scheint der manuellen überlegen. Die vorliegende Analyse zeigt aber, dass eine vorgeschaltete Sensitivitätsanalyse einen Hinweis darauf geben kann, welche Alignmentmethode für einen gegebenen Datensatz die bessere ist.

Der Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Kongruenzmaßen und Unterstützungswerten sollte ebenfalls untersucht werden, wozu ILD und RILD verwendet

wurden. Wichtig ist dabei der Hinweis, dass hier ILD als einfaches heuristisches Maß für Kongruenz verwendet wird. Insgesamt wurde eine beachtliche Übereinstimmung zwischen ILD (und RILD), Jackknife-Unterstützung und topologischer Kongruenz gefunden. Die meisten ILD- und RILD-Werte favorisieren dieselben Gewichtungsregime wie die Verzweigungs-Unterstützungswerte und die topologischen Kongruenzmaße.

Die Berechnung der Gesamtunterstützung eines Baums erfolgte mit dem Jackknife-Verfahren, weil hierbei die Werte weniger mit der topologischen- und der Merkmalsinkongruenz in Beziehung stehen. Dennoch ist dieses Verfahren sehr ähnlich dem Bootstrap-Verfahren.

Interessanterweise lieferte das untersuchte COI-Gen fast die gesamte Baumunterstützung. Man könnte einwenden, dass dieses Gen aufgrund seines großen Beitrags zum Gesamtdatensatz die anderen Gene überwiegt. Dennoch zeigen auch die Analysen der restlichen Gene ohne das COI-Gen annähernd dieselbe Topologie wie das COI-Gen allein, was diesen Einwand entkräftet. Außerdem ist beachtenswert, dass das einzige nukleäre Gen einen negativen Beitrag zu den Gesamtunterstützungswerten liefert und, alleine betrachtet, die Phylogenie der Gattung *Themira* innerhalb der Sepsidae nur unklar, ja falsch abzubilden vermag, deren Monophylie durch die anderen Sequenzdaten eindeutig unterstützt wird.

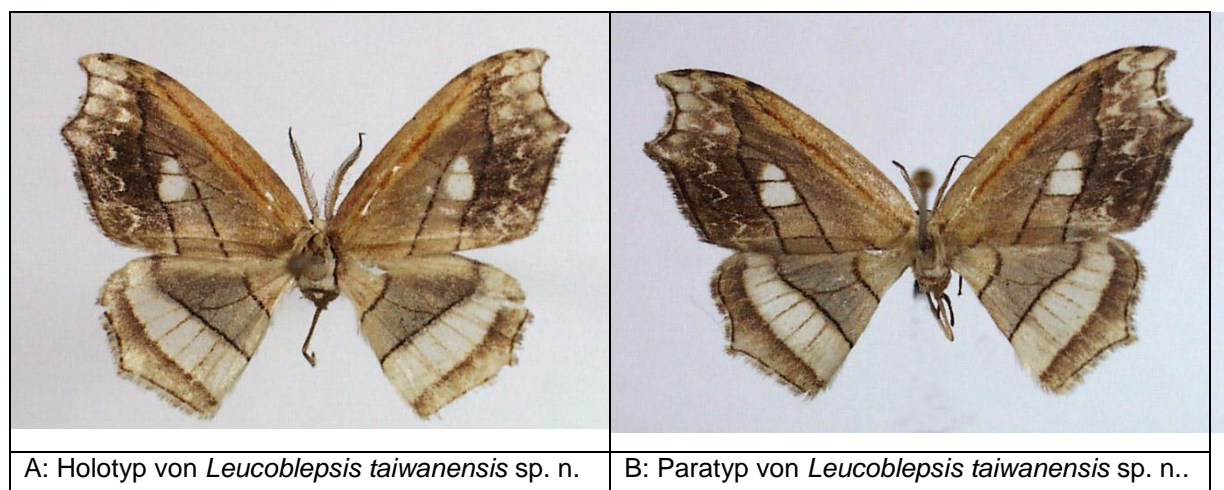


**Abbildung 2: Phylogenie der Gattung *Themira***

Sparsamster Baum aller Alignments und Idel-Bewertungen mit den optimalen Analysebedingungen ( $tv = 2$ ). Die schwarzen Felder im Sensitivitätsplot bedeuten Übereinstimmung, die weißen Widerspruch und die grauen keines von beiden (Polytomien). MF = manuelles Alignment, Indels = fünftes Merkmal, MM = manuelles Alignment, Indels = fehlendes Merkmal; CF = Clustal - Alignment, Indels = fünftes Merkmal; CM = Clustal - Alignment, Indels = fehlendes Merkmal. Die angenommene Stellung von *T. leachi* und *T. gracilis* wird durch die Pfeile angezeigt. Gleiche Gewichtung bei der MM - Analyse widerspricht der Verzweigung 4. Die Unterstützung ist auf den Ästen als Jackknife/Bremer-Support - Werte ausgewiesen. **Aus:** Laamanen, T. R., Meier, R., **Miller, M.A.**, Hille, A. & Wiegmann, B.M. (2005): Phylogenetic analysis of *Themira* (Sepsidae: Diptera): Sensitivity Analysis, Alignment, and Indel Treatment in a Multigene Study. *Cladistics* 21 (2005): 258-271.

### 4.3 Neubeschreibungen

Bei der Neubeschreibung von *Leucoblepsis taiwanensis* (Buchsbaum & Miller 2002) zeigte sich eine genetische Variationsbreite von 10,25% zwischen der neuen Art und des intrafamiliären Vergleichsvertreter *Drepana falcataria* (154 variable Positionen von 1502bp COI), sowie 13,79% zum Außengruppenvertreter *Bombyx moori*. Innerhalb der Typenserie waren 17 Positionen variabel, die alle einzeln aufgeführt wurden (s.u.). Die resultierende Sequenzdivergenz von 1,09% scheint zwar erwartungsgemäß gering, birgt aber dennoch ein leichtes phylogenetisches Signal bei acht der 17 Positionen. Alle Sequenzdaten wurden in GenBank deponiert, um *Leucoblepsis taiwanensis* mit seiner spezifischen DNA-Sequenz der Wissenschaft auch für online-Bestimmungen leicht verfügbar zu machen.



**Abbildung 3: Holotypen der neubeschriebenen *Leucoblepsis taiwanensis* sp. nov.**

Proben- Status&ID	Pos. COI:	66	255	258	402	708	747	979	999	1083	1098	1198	1287	1308	1314	1319	1362	1404
Holotypus DNATAX00568		A	T	C	C	A	T	A	C	T	T	C	G	A	T	A	G	C
Paratypus 1 DNATAX00563		A	A	A	T	A	T	G	T	T	C	T	G	A	T	A	G	T
Paratypus 2 DNATAX00567		G	A	A	T	A	T	A	T	T	C	T	G	T	A	C	G	T
Paratypus 3 DNATAX00570		A	T	C	C	A	T	A	C	T	T	C	G	A	T	A	G	C
Paratypus 4 DNATAX00573		G	T	C	T	A	G	A	C	T	C	T	A	A	T	A	G	T
Paratypus 5 DNATAX00574		G	T	C	T	G	T	A	C	C	C	T	G	A	T	A	A	T

**Abbildung 4: Tabelle der variablen Basenpositionen bei *Leucoblepsis taiwanensis* sp.nov.**

Die variablen Basenpositionen des COI-Gens beim Holotyp und fünf der Paratypen der neuen Drepanidenart *Leucoblepsis taiwanensis* Buchsbaum & Miller, 2002. Das, wenn auch geringe, phylogenetische Signal könnte auf die Existenz von zwei Unterarten in der Typenserie hinweisen. **Abb. 3&4 aus:** Buchsbaum, U. & Miller, M.A. (2002): *Leucoblepsis taiwanensis* sp. nov., a new species of Drepanidae from Taiwan (Insecta: Lepidoptera). Formosan Entomologist 22: 101-114, verändert.

Es konnte gezeigt werden, dass in wissenschaftlichen Neubeschreibungen der technische Aufwand bei der Einbeziehung von DNA-Sequenzdaten vergleichsweise gering gehalten werden kann und auch bei Gruppen, von denen noch kaum Informationen über deren molekulare Ausstattung verfügbar ist, zumindest der Grundstein für die molekulare Kenntnis gelegt werden sollte.

Ebensolches galt für die Neubeschreibung von *Paracymoriza naumanniella* Buchsbaum, Speidel & Miller, 2004 (siehe Anhang). Die Sequenz des Holotyps bestand aus 1230bp des COI-Gens, vier der elf Paratypen wurden komplett mit jeweils 1530bp COI sequenziert. Die Variationsmatrix war hier noch homogener als bei der vorgenannten Arbeit: nur sechs variable Positionen fanden sich innerhalb des COI-Gens, das entspricht 0,39%.

Proben-Status&ID	Pos. COI:	69	309	351	708	1113	1283
Holotypus DNATAX02820		G	T	T	G	A	n.a.
Paratypus 1 DNATAX02821		G	T	T	G	A	T
Paratypus 2 DNATAX02823		G	T	T	G	A	G
Paratypus 3 DNATAX02824		A	C	C	A	G	T
Paratypus 4 DNATAX02825		G	T	T	G	A	T

**Abbildung 5: Tabelle der variablen Basenpositionen bei *Paracymoriza naumanniella* sp. nov.**

Die variablen Basenpositionen des COI-Gens beim Holotyp und vier der Paratypen der neuen Zünslerart *Paracymoriza naumanniella* Buchsbaum, Speidel & Miller, 2004. Die Abkürzung „n.a.“ bei Position 1283 des Holotyps bedeutet, dass an dieser Stelle keine Sequenzinformation vorhanden war.  
**Aus:** Speidel, W., Buchsbaum, U. & Miller, M.A. (2005): A new *Paracymoriza* species from Lombok (Indonesia) (Lepidoptera, Crambidae). Bonner Zoologische Beiträge 53 (1/2), 227-234, verändert.

Dieser sehr geringe Sequenzunterschied mag auch darauf beruhen, dass die Typenserie zur Gänze am *locus typicus* gesammelt wurde und die Individuen damit wohl einer einzigen Population angehörten.



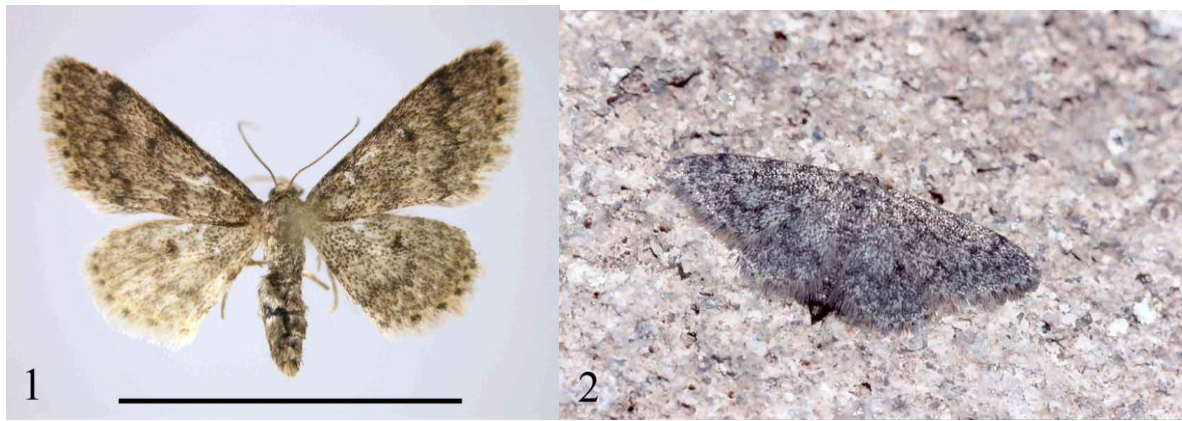
**Abbildung 6: Typen von *Paracymoriza naumanniella* sp. nov. Speidel, Buchsbaum & Miller, 2004**

*Paracymoriza naumanniella* sp. n. Holotyp (männlich) (A) und ein Paratyp (weiblich) (B). Indonesien, Nord - Lombok, Gunung, Rinjani NP, Air terjun, in der Nähe des Dorfes Senaru, ca. 500 - 600 m, 08°18' S / 116°24' E, 28. Dezember 2003, TF, leg. Mei-Yu Chen & Ulf Buchsbaum. **Aus:** Speidel, W., Buchsbaum, U. & **Miller, M.A.** (2005): A new *Paracymoriza* species from Lombok (Indonesia) (Lepidoptera, Crambidae). *Bonner Zoologische Beiträge* 53 (1/2), 227-234.

Zusätzlich zu Lebend- und Präparatfotos konnten in dieser Arbeit auch Genitalabbildungen, Fundortfotos und rasterelektronenmikroskopische Fotos eines bei der Mazeration des Abdomens gefundenen Eis geliefert werden, womit eine Vielzahl verschiedener Charakteristika dieser neuen Art in die Erstbeschreibung inkludiert wurden.

Bei *Idaea nigra* Hausmann & Bläsius, 2007 von La Gomera, Kanarische Inseln, wurde erfolgreich die Trennung von den erstbeschreibenden Autoren und den Koautoren des die Erstbeschreibung beinhaltenden Aufsatzes vollzogen. Hintergrund ist die Tatsache, dass manche erstbeschreibenden Wissenschaftler zwar einerseits gerne molekulare Daten in die Neubeschreibung einfließen lassen möchten, diese aber nicht selbst generieren können. Der zu Hilfe gezogene Kollege soll für seine Arbeit als Koautor „entlohnt“ werden, nicht aber als Autor der namenstragenden neuen Art aufscheinen. Deshalb behilft man sich mit einer Form der Publikation, die als Aufsatz nicht die Erstbeschreibung IST, sondern sie BEINHALTET (Hausmann, **Miller**, Leipzig & Bläsius 2007). Der Methodenteil konnte hier entsprechend knapp gehalten werden, da die Generierung der molekularen Daten inhaltlich nicht entscheidend war, sondern vielmehr das Resultat. Dieses zeigte, dass auf den 440bp COI-Sequenz keine Variabilität gefunden wurde.





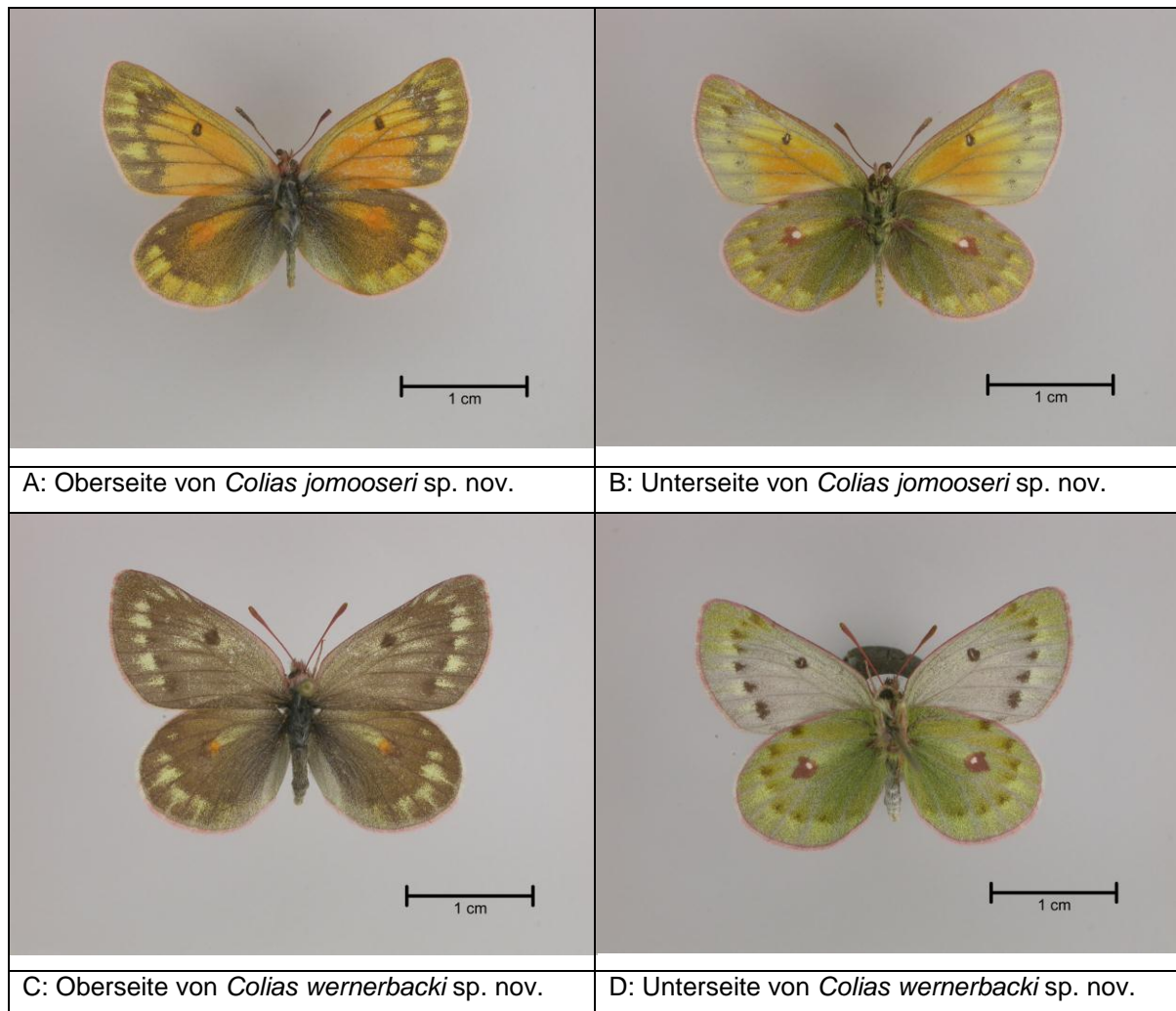
**Abbildung 7: *Idaea nigra* Hausmann & Bläsius sp. nov.**

**1:** Holotype (männlich), Kanarische Inseln, La Gomera, Valle Gran Rey, La Playa, 50m, e.o. 24.VIII.2006 (30.V.2006), leg. R. Bläsius, coll. ZSM (photo AH). Scale bar = 1 cm. **2:** Weibchen in Ruhestellung (Paratyp), Kanarische Inseln, La Gomera, Valle Gran Rey, La Playa, 50m, e.o. F2, November 2006 (Foto M. Leipnitz). **Aus:** Hausmann, A., **Miller, M. A.**, Leipnitz, M. & Bläsius, R. (2007): *Idaea nigra* Hausmann & Bläsius, sp. n. from La Gomera, Canary Islands, Spain (Lepidoptera: Geometridae, Sterrhinae). SHILAP Revta. lepid., 35 (140): 1-7.

Diese Sequenzen wurden in einem kleinen Datensatz einer früheren Arbeit mit den DNA-Sequenzen von zehn anderen West - paläarktischen *Idaea*-Arten verglichen, wobei als Schwesterart *Idaea charitata* (Rebel, 1914) identifiziert wurde. Die Sequenzdifferenz betrug 3,6%. Da aufgrund eines weiteren Sequenzierprojektes von insgesamt 44 Arten der Gattung *Idaea* 115 Vergleichssequenzen zur Verfügung standen, konnte die genetische Distanz auch graduell beurteilt werden. Die infraspezifische Varianz beträgt demnach in dieser Gattung gemittelt 0,34%, die mittlere infragenerische Sequenzvariationsbreite beträgt 10,1%. Damit ist der o.a. Wert von 3,6% zwischen der neuen Art *Idaea nigra* und *Idaea charitata* auf niedrigem Niveau, was das Schwesterverhältnis der beiden Arten verdeutlicht. Die Einteilung von *I. nigra* in die *rusticata*-Artengruppe erfolgte durch die Clusterung der beiden Schwesterarten mit den Arten *I. rusticata* ([Dennis & Schiffermüller], 1775) (6,1% Sequenzunterschied) und *I. filicata* (Hübner, 1799) (7,5% Sequenzunterschied). Durch die Dokumentation der ersten Stände, Fotos des Fundortes und des Lebend-Habitus, der Raupe und Puppe und der Genitalarmaturen sowie REM-Fotos der Cremaster der Puppe und des Chorion des Eis konnte die neue Art auf einzigartige Weise erfasst und der Wissenschaft präsentiert werden. Als nicht zufriedenstellend bleibt aber anzumerken, dass die Rohsequenzen der DNA im Text nicht aufscheinen, sondern nur die Akzessionsnummern der GenBank-Datenbank angegeben sind, unter der die COI-Sequenzen hinterlegt wurden.

Dieses Manko wurde bei **Miller** (2009) vermieden, indem sämtliche Rohsequenzen als Textbestandteile gedruckt in der Erstbeschreibung erschienen und damit integraler Bestandteil wurden. Für die neue Art *Colias jomooseri* Miller 2009 wurden somit 1110bp COI

und 134bp H3 definiert, für *C. wernerbacki* Miller, 2009 sogar 1540bp COI, 328bp H3, 458bp EF-1 $\alpha$  und 528bp 28SrDNA, insgesamt also 2854bp des jeweiligen Holotyps (siehe Abb. 5). Zunächst wurde die Konspezifität der beiden Individuen der recht variablen Gattung *Colias* durch Sequenzvergleich ausgeschlossen, wozu das COI-Gen über die gesamte homologe Länge von 1110bp verwendet wurde. Es ergab sich eine Sequenzdifferenz von 3,33%, was nach eigener Erfahrung mit Pieriden, aber auch gestützt durch Befunde anderer Autoren (Wheat & Watt 2008) die innerartliche Variationsbreite um etwa das Zehnfache übersteigt.



#### Abbildung 8: Holotypen der neubeschriebenen *Colias*-Arten

**Aus: Miller, M.A.** (2009): *Colias jomooseri* spec. nov. und *Colias wernerbacki* spec. nov., zwei neue Gelblingsarten vom Himalaya - Gebirge, Bhutan (Lepidoptera: Pieridae). *Atalanta* 40 (3/4): 479-486; 529-530.

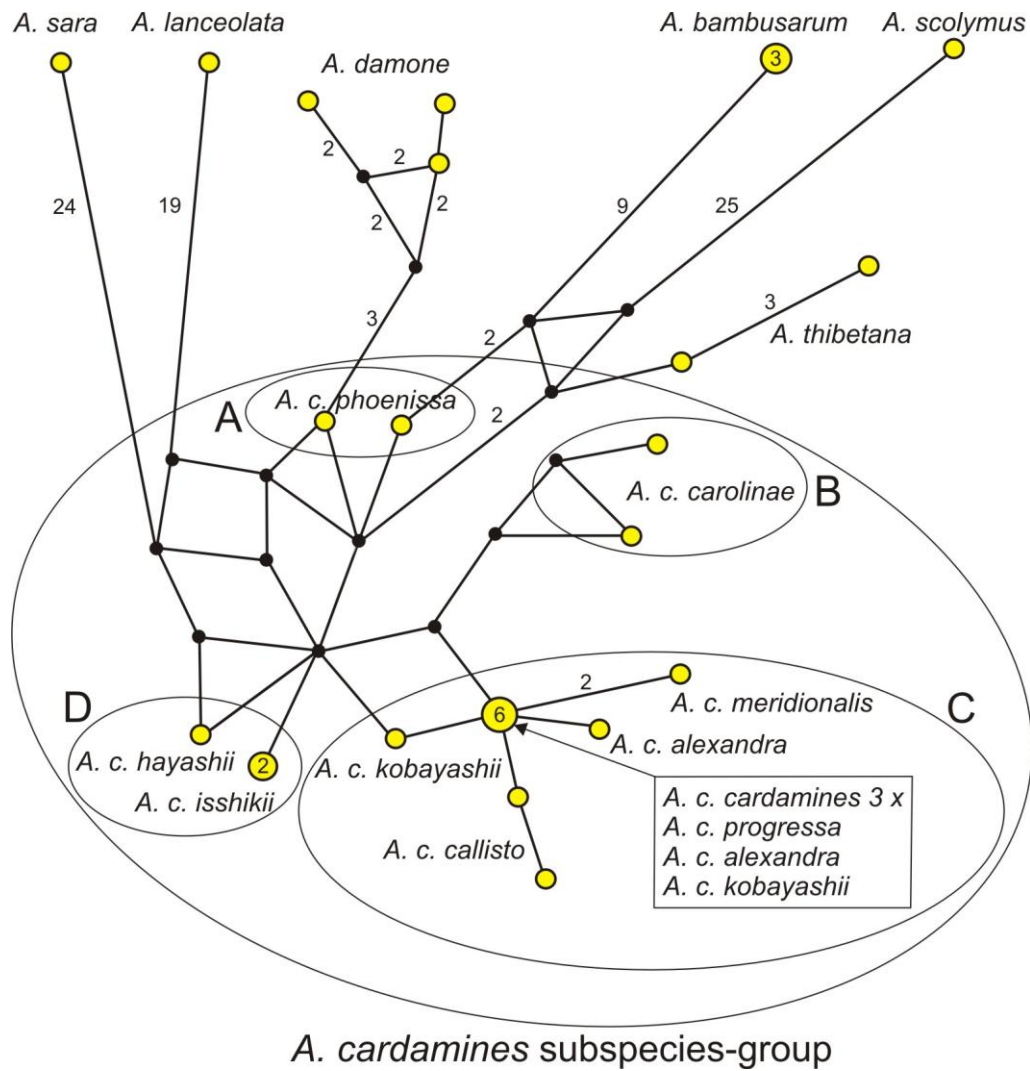
In einer tabellarischen Gegenüberstellung eventuell infrage kommender konspezifischer Taxa mit ähnlichem Habitus und/oder Verbreitungsgebiet, basierend auf einem 343bp langen Teilstück des COI-Gens betrug die genetische Distanz zwischen 2,62% (*C. wernerbacki* vs. *C. stoltzкана miranda*) und 4,37% (*C. jomooseri* und *C. wernerbacki* vs. *C. t. tamerlana*; *C.*

*jomooseri* vs. *C. t. thibetana*). Diese Werte fallen im Vergleich zu den Populationsanalysen von Wheat & Watt (2008) so deutlich erhöht aus, dass die Neubeschreibung der beiden Arten dringend angezeigt war, um sie der Wissenschaft verfügbar zu machen. Die Differentialdiagnose erstreckte sich bei dieser Arbeit in einzigartiger Weise zusätzlich auf die molekularen Merkmale und bestätigt damit die Rechtfertigung der Beschreibung.

#### 4.4 Artabgrenzungen/Phylogenie

Die Untersuchungen des engeren Verwandtenkreises innerhalb des Artenkomplexes um *Anthocharis cardamines* (Back, Knebelsberger, Miller 2006a) erfolgten auf der Basis von 314bp des COI-Gens. 23 Probestiere wurden ausgewählt, dazu kamen sechs bereits publizierte DNA-Sequenzen aus GenBank und mit *Pieris napi* ein Außengruppenvertreter. Die Sequenzen aller Tiere wurden tabellarisch abgebildet, um die variablen Positionen zu veranschaulichen. Innerhalb der *Anthocharis*-Sequenzen waren 66 variabel, was einem Anteil von 21% entspricht. Innerhalb der Unterarten von *A. cardamines* waren es immerhin noch 13 variable Positionen, also 4,1%. Die graduellen Unterschiede zwischen den Artenpaaren *A. cardamines* ssp. und anderen *Anthocharis* – Arten lag zwischen vier variablen Positionen zwischen *A. c. phoenissa* und *A. thibetana* bis zu 28 variablen Positionen zwischen *A. c. phoenissa* und *A. scolymus*.

Die Unterarten von *A. cardamines* formten ein engmaschiges Cluster, das die Haplotypenbeziehungen veranschaulicht (siehe Abb. 6). Es ließen sich die Untergruppen „*phoenissa*“, „*carolinae*“, „*cardamines*“ und „*isshikii*“ abgrenzen und definieren: Die Untergruppe „***phoenissa***“ zeigt keine Autapomorphien und keine terminale Stellung in der Netzwerkanalyse, aber die genetischen Distanzen zu den Nächstverwandten sind erstaunlich hoch. Dass aber persistierender Genaustausch möglich ist, zeigt sich auch auf morphologischer Ebene: Tiere vom Rand des Verbreitungsgebietes, beispielsweise aus Anatolien, weisen Merkmale dieser und der angrenzenden *A. c. cardamines* auf. Die „***carolinae***“ – Untergruppe zeigt deutlich höhere Distanzwerte als die anderen Untergruppen. Sie ähneln denen von gut getrennten Arten. Da dieses Taxon zusätzlich an einer terminalen Position im Netzwerk aufscheint, ist die Behandlung von *A. c. carolinae* als *species bona* ebenfalls zu überlegen.

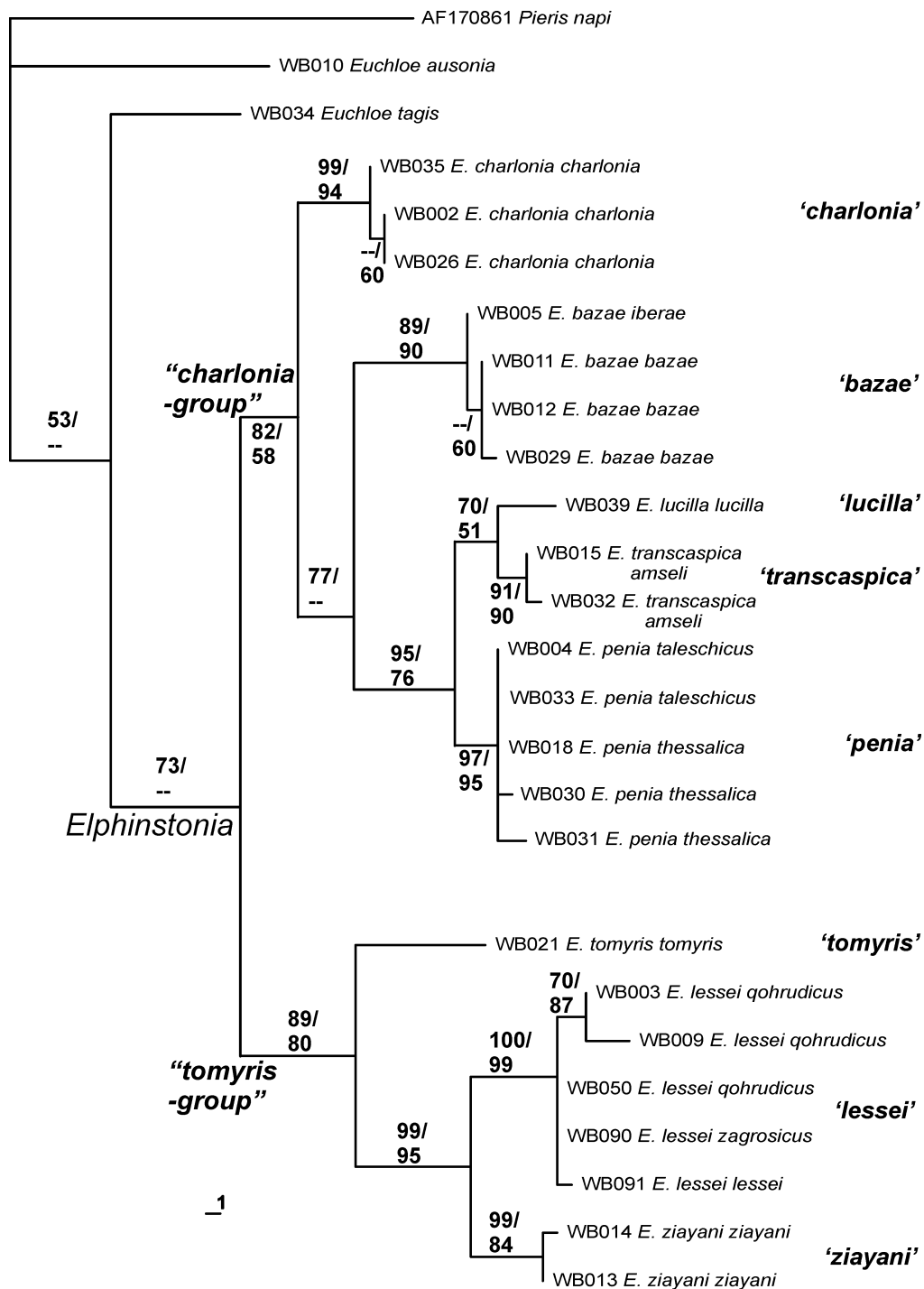


**Abbildung 9: Netzwerkanalyse der Unterarten von *Anthocharis cardamines***

**Aus:** Back, W., Knebelberger, T. & Miller, M.A. (2006a): Molecular investigation of the species and subspecies of the genus *Anthocharis* BOISDUVAL, RAMBUR, DUMÉRIL & GRASLIN, 1833 with special focus on the *cardamines* – group (Lepidoptera: Pieridae). *Linneana Belgica* 20 (6), 245-253.

Die Untergruppe „*cardamines*“ mit Populationen von *A. c. cardamines* deckt ein Untersuchungsgebiet über ganz Eurasien ab. Dadurch ergeben sich viele genetische Beziehungen zwischen den einzelnen Vertretern, wozu auch die Unterarten *A. c. kobayashi*, *A. c. alexandra* und *A. c. progressa* gehören, die sich nicht deutlicher abtrennen lassen und neuere Speziationsprozesse abbilden. Terminale Positionen nehmen hier die Unterarten *A. c. meridionalis* von Spanien und *A. c. callisto* von Tadschikistan ein, die sich schon weitestgehend von den anderen Populationen und Unterarten isoliert haben. Die Untergruppe „*isschikii*“ besteht aus dieser und der Unterart *A. c. hayashii*, sie zeigt genetische Verbindungen zu *A. c. cardamines* und *A. c. phoenissa* und scheint sich weiter zu isolieren, wofür die terminale Stellung von *A. c. isschikii* ein Indiz sein könnte.

Bei der Arbeit über die Untergattung *Elphinstonia* Klots, 1930, ging es um die phylogenetische Analyse und die der Verwandtschaftsverhältnisse der bekannten Taxa innerhalb dieser Untergattung (Back, Knebelsberger & **Miller** 2006b). Die Resultate zeigten eine klarere Auftrennung der Taxa, als es bei der *Anthocharis*-Analyse der Fall war (siehe Abb. 7). Dies lag daran, dass hier sämtliche bekannte Arten in die Analyse einbezogen wurden und aufgrund der größeren genetischen Distanzen die standardmäßigen phylogenetischen Algorithmen der Parsimonie, Likelihood und Bayesianischen Analyse Anwendung fanden. Zunächst wurde damit die Monophylie der Untergattung bestätigt. Zudem teilt sich die Untergattung mit hoher Unterstützung in zwei Gruppen: die „**charlonia**-Gruppe“ und die „**tomyris**-Gruppe“.



**Abbildung 10: Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse der Untergattung *Elphinstonia***

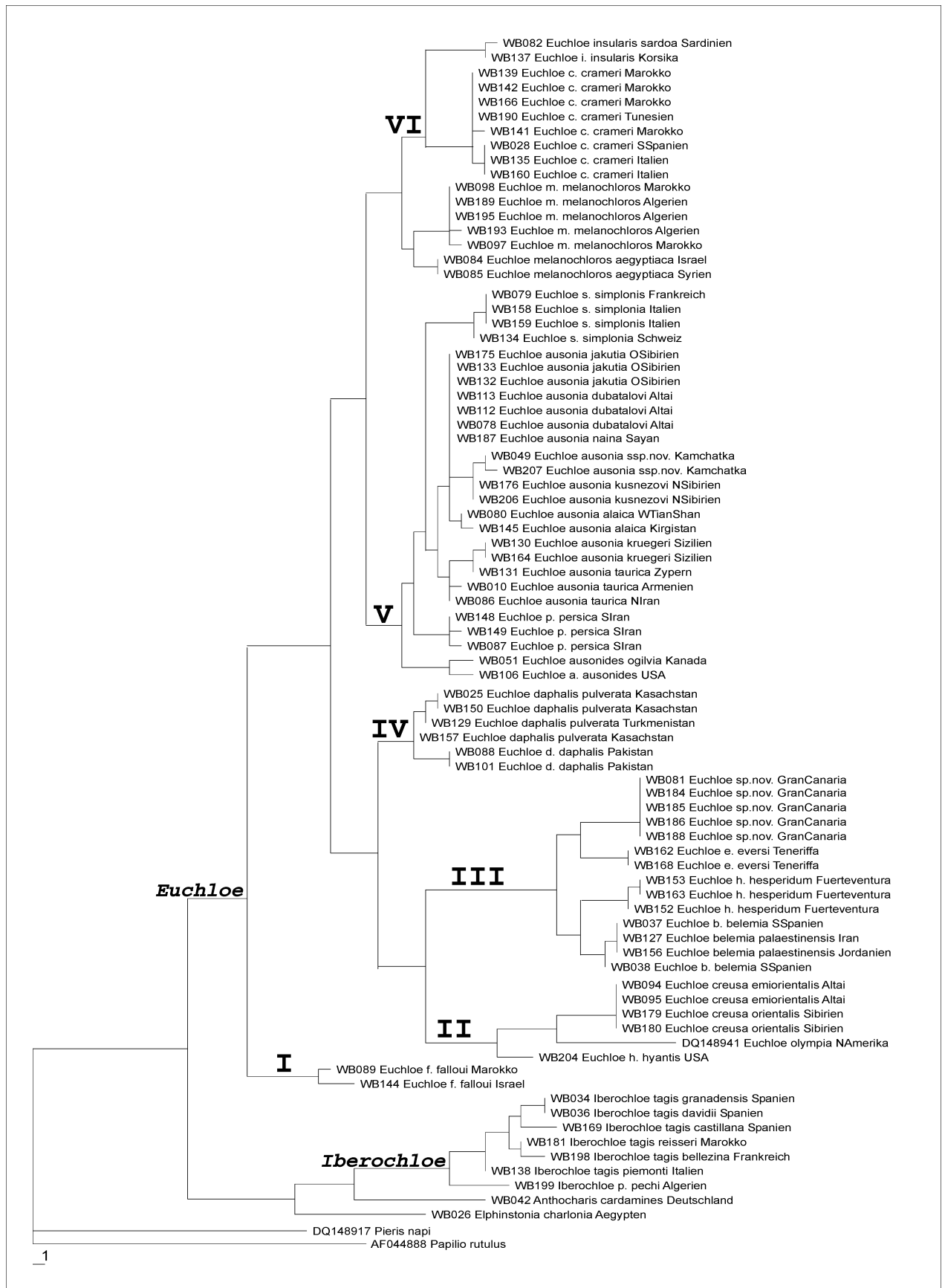
Aus: Back, W., Knebelberger, T. & Miller, M.A. (2006b): The phylogenetic relationships of the species and subspecies of the subgenus *Elphinstonia* KLOTS, 1930 (Lepidoptera: Pieridae). *Atalanta* 20 (6), 245-253.

Die „*charlonia*-Gruppe“ bestand aus den Arten *Elphinstonia charlonia*, *E. bazae*, *E. lucilla*, *E. transcaspica* und *E. penia*. Die „*tomyris*-Gruppe“ bestand aus den Arten *Elphinstonia tomyris*, *E. lessei* und *E. ziyani* mit jeweils hoher bis sehr hoher statistischer Unterstützung.

Ein unerwartetes Ergebnis war die Position von *E. penia* innerhalb der „*charlonia*-Gruppe“, da diese Art aufgrund ihres Phänotyps und ihrer Ökologie eher als Teil der „*tomyris*-Gruppe“ betrachtet wurde. *E. penia* ist weit verbreitet in der Schwarzmeerregion und besiedelt dicht bewachsene Habitate, in denen auch die Raupenfutterpflanze *Mattiola* sp. (Brassicaceae) gedeiht. Zudem unterscheiden sich die Raupen und Puppen deutlich von denen von *E. charlonia*, *E. bazeae* und *E. transcaspica*, alles Arten, die in Steppen- und Wüstengebieten beheimatet sind.

Zwei Arbeiten befassten sich mit der Gattungsanalyse der Großgattung *Euchloe* Hübner, [1819]. Die erste der beiden (Back, Knebelsberger & Miller 2008) befasst sich ausführlich mit den elf bekannten paläarktischen Arten der Gattung und errichtete eine stabile phylogenetische Baumrekonstruktion dieser Arten und einiger Unterarten (siehe Abb. 8). Die genetischen Distanzen zwischen den mit einbezogenen Unterfamilien schwankten zwischen 12-15%, diejenigen der Gattungen zwischen 5-11%, die von Artengruppen zwischen 5-10% und die von ausgewählten, nächstverwandten Arten untereinander zwischen 2-4%. Untersuchte Unterarten lagen noch darunter (1-2%).

Zuerst fiel bei diesem übergreifenden Analyseansatz auf, dass die Arten um *E. tagis* als Monophylum derart große genetische Distanzen zu den anderen Gattungen aufwiesen, dass dieses Taxon konsequenterweise als neue Gattung *Iberochloe* Back, Knebelsberger & Miller, 2008 abgetrennt wurde. Die Gattung *Iberochloe* enthält zwei gute Arten. Neben *I. tagis* (Hübner, 1804) ist das *I. pechi* (Staudinger, 1885) mit deutlich unterschiedlichem Habitus, obwohl bezüglich Raupe, Puppe und Lebensweise keine Unterschiede bestehen (Basendifferenz fast 3 %). Es wurden aber habituelle Übergangsformen zu *tagis* (vgl. ssp. *reisseri*, Back & Reissinger 1989) beschrieben. Hier hat das isolierte Vorkommen am Ende des Verbreitungsareals offensichtlich zur genetischen Differenzierung geführt (allopatrische Speziation). Die weiteren Taxa *castellana* (Verity, 1911), *bellezina* (Boisduval, 1829) und *piemonti* (Back, 2001) zeigen zwar bei mehreren Basenpaaren Unterschiede, graduell liegen diese aber im infraspezifischen Bereich, so dass hier auch aus phylogenetischer Sicht von gut definierten Unterarten gesprochen werden kann.

Abbildung 11: Distanzanalyse-Baum der Gattungen *Euchloe* und *Iberochloe* gen. nov.

**Aus:** Back, W., Knebelberger, T. & Miller, M.A. (2008): Molekularbiologische Untersuchungen und Systematik der paläarktischen Arten von *Euchloe* HÜBNER, [1819] (Lepidoptera: Pieridae). Entomologische Zeitschrift Stuttgart 118 (4): 147-169.



Ebenso wurde die Untergattung *Elphinstonia* in den Gattungsrang erhoben, womit die Anthocharidini innerhalb der Pierinae nun aus den fünf Gattungen *Iberochloe*, *Euchloe*, *Anthocharis*, *Elphinstonia* und *Zegris* bestehen.

Die nach dieser Analyse neu geordnete Gattung *Euchloe* Hübner, [1819] enthält nunmehr im paläarktischen Verbreitungsgebiet 13 gut unterscheidbare und genetisch definierte Arten, die sich wiederum in sechs Artengruppen einteilen lassen:

**Artengruppe I** liegt an der Basis des Kladogramms und wird repräsentiert durch *E. falloui* (Allard, 1867). Im großen Verbreitungsgebiet mit teilweise sehr isoliertem Vorkommen sind die Basenunterschiede dennoch nur gering (< 1 % bei Tieren von Marokko und Israel). Da sowohl im Genotyp als auch im Phänotyp gewisse Ähnlichkeiten mit *I. tagis* vorhanden sind, könnte diese Art als "Bindeglied" zwischen den beiden Gattungen *Euchloe* und *Iberochloe* angesehen werden.

Die **Artengruppe II** wird von *E. creusa* (Doubleday & Hewiston, 1847) repräsentiert. Die Stammform ist nearktisch in Alaska, Yukon und in den Rocky Mountains verbreitet. Von NO-Sibirien und Kamchatka wurde die Unterart *orientalis* (Bremer, 1864) und vom Altai die Unterart *emiorientalis* Verity, 1911 beschrieben. Trotz weit entfernter Fundorte der Probestiere war bei den 4 Exemplaren (Altai, Jakutien, Bilibino) kein genetischer Unterschied festzustellen. Dies spricht für einen intakten Genaustausch im gesamten Gebiet und zeigt sich auch im Phänotyp, der bis auf *emiorientalis* keine signifikanten Unterschiede bei den verschiedenen Populationen aufweist.

Die **Artengruppe III** wird durch die Art *E. belemia* (Esper, 1799) repräsentiert. Dabei weisen Tiere von Südspanien, Palästina und Persien eine hohe genetische Übereinstimmung auf, was für einen hohen Grad an genetischem Austausch innerhalb des Verbreitungsgebiets von Portugal und Spanien über N-Afrika bis Persien spricht. Allerdings bestehen deutliche genetische Unterschiede bei den Populationen der Kanarischen Inseln. Hier sind die Tiere von Fuerteventura noch am nächsten mit der Stammform verwandt, besitzen aber eine genetische Distanz zur Stammform von mehr als 2 %, was zur Aufwertung der bisherigen Unterart *hesperidum* Rothschild, 1913 auf Artniveau führt. Der genotypische und phänotypische Unterschied zur Stammform ist bei den Populationen von Teneriffa und Gran Canaria noch deutlicher. Hier haben sich durch langfristige Isolation eigenständige Genotypen (Unterschiede in 9 Basenpaaren, entspricht mehr als 2 % Sequenzdifferenz) entwickelt, so dass es sich um gute Arten handelt. Die Tiere von Teneriffa erhalten somit den Artnamen *E. eversi* Stamm, 1963, die Tiere von Gran Canaria wurden mittlerweile als *E. grancanariensis* Acosta, 2008 neu beschrieben.

Zur **Artengruppe IV** gehören Tiere, die bisher meist als *E. daphalis* (Moore, 1865) bzw. *E. pulverata* (Christoph, 1884) determiniert wurden. Erstere Art wurde aus dem NW-Himalaya beschrieben. *E. pulverata* kommt im nördlich angrenzenden Gebiet (Kyrgyzstan, Tajikistan) sowie in den transkaspischen Steppen bis ins östliche Kasachstan vor. Die genetischen Unterschiede zwischen den beiden Taxa sind nur gering, so dass es sich nach der empfohlenen taxonomischen Bewertung lediglich um zwei Unterarten handelt. Aus zoogeographischer Sicht kann ein gewisser Genaustausch über die Täler des westlichen Himalayas und über den westlichen Tian Shan auch nicht ausgeschlossen werden.

Da der Name *daphalis* Priorität hat, besteht die genetisch gut abgegrenzte Gruppe IV konsequenterweise nur aus der einen Art *E. daphalis* mit den beiden Unterarten *E. d. daphalis* und *E. d. pulverata*.

Die **Artengruppe V** stellt bezüglich Artenvielfalt und Verbreitungen den dominierenden genetischen Zweig dar und wird von *E. ausonia* (Hübner, 1804) als Leitart repräsentiert. Diese bivoltine Art ist von Italien bis Iran weit verbreitet, wobei zahlreiche Unterarten beschrieben worden sind: Südliches Italien, Toscana, Elba: *ausonia* (Hübner, 1804); Sizilien: *kruegeri* Turati, 1905; Balkan, Griechenland einschließlich der meisten Inseln, W-Türkei: *graeca* Verity, 1908; südliches Russland, S-Ural, Ukraine: *volgensis* Krulikowski, 1901; Krim: *maxima* Verity, 1908; Türkei, Zypern, Armenien, N-Irak, Kaukasus, Talysh, NO-Persien über Elburs bis westliches Kopet Dag: *taurica* Röber, 1907; Libanon, Syrien, N-Israel, N-Jordanien: *melisande* Fruhstorfer, 1908. Die verschiedenen Populationen zeigen meist geringe phänotypische und genotypische Unterschiede. Letztere bewegen sich mit weniger als 2 % im infra-spezifischen Bereich, so dass lediglich die Benennung von Unterarten, insbesondere wenn sie auch morphologisch differenzierbar sind, sinnvoll ist.

Einen sehr einheitlichen genetischen Block bilden die als *E. naina* (Kozhantschikoff, 1923) bezeichneten Populationen vom Sayan (Typuslokalität), *E. naina jakutia* Back, 1990 aus Jakutien, Magadan, Bilibino und von der sehr isolierten Wrangel-Insel sowie *E. ausonia dubatolovi* Korshunov, 1995 vom Altai (Korshunov & Gorbunov, 1995).

Einen weiteren Block bilden die Exemplare von *E. simplonia* (Boisduval, 1828). Die einbrütige Art ist auch in ihren phänotypischen Adult-Merkmalen gut charakterisiert. Raupe und Puppe unterscheiden sich ebenfalls etwas von *E. ausonia* und *E. crameri* (Back 1991a; Schweiz. Bund für Naturschutz 1987; Gomez de Aizpurua 1988). *E. simplonia* kommt in den Westalpen, Pyrenäen und im Kantabrischen Gebirge vor.

Exemplare, die als *E. pulverata persica* Verity, 1908 determiniert worden waren, fanden sich im Verwandtschaftsbereich von *E. ausonia* wieder. Sie treten innerhalb der Artengruppe V hervor und werden aufgrund der deutlichen genetischen Distanzen als eigene Art *E. persica*

Verity, 1908 eingestuft. Die Art kommt in den Steppen- und Wüstengebieten Persiens sowie im südlichen Irak vor.

Für die **Artengruppe VI** ist *E. crameri* Butler, 1869 die Leitart. Diese Art ist von Italien (östl. bis Modena), über Frankreich (Einzelfunde bis Belgien), Spanien und Portugal sowie NW-Afrika verbreitet. In NW-Afrika ist das Vorkommen auf die nördlichen Küstenregionen und die benachbarten Gebirge (Rif, mittlerer und hoher Atlas) beschränkt (vgl. Rothschild, 1917). Weiters handelt es sich bei den Tieren vom südlichen Antiatlas, Sahara-Atlas, Djebel Aurès und von den angrenzenden Wüsten- und Steppengebieten um die eigene Art *E. melanochloros* Röber, 1907, die ursprünglich von Röber in Seitz (1907) als Form aus Batna, Algerien beschrieben wurde. *E. melanochloros* weist deutliche genetische Unterschiede zur nächstverwandten Art *E. crameri* auf. Dagegen können keine signifikanten phänotypischen Merkmale hervorgehoben werden, wobei aber beim Vergleich von Serien auffällt, dass die Falter von *E. melanochloros* durchschnittlich kleiner und in beiden Geschlechtern dunkler gefärbt sind. Der Apex der Vorderflügel erscheint etwas nach außen gezogen. Die weißen Flecken auf der Hinterflügel-Unterseite sind kleiner und regelmäßiger angeordnet. Zwischen den beiden Generationen bestehen keine so großen Unterschiede wie bei *E. crameri*.

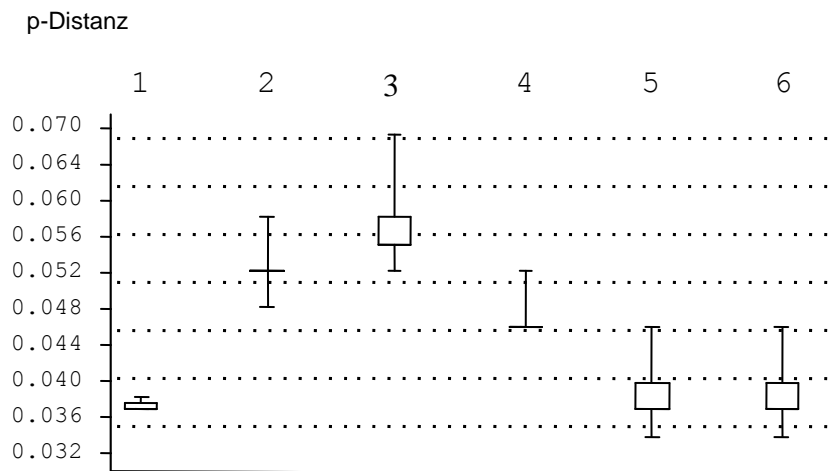
Nach dem molekularbiologischen Bewertungsschema und wegen nur geringer phänotypischer Unterschiede gibt es drei differenzierbare Unterarten: *E. melanochloros* ssp. *melanochloros* Röber, 1907, *E. melanochloros* ssp. *aegyptiaca* Verity, 1911 und vermutlich *E. melanochloros* ssp. *libyca* Turati, 1917 (DNA-taugliches Material stand für die Untersuchung nicht zur Verfügung).

*E. insularis* (Staudinger, 1861) ist eine weitere genetisch gut abgegrenzte Art der Artengruppe VI. Die Art kommt endemisch ausschließlich auf Korsika und Sardinien vor, wobei zwischen den beiden Inselpopulationen phänotypisch und genotypisch keine signifikanten Unterschiede bestehen.

Die zweite Arbeit über *Euchloe*-Arten (Back, Opler & Miller 2011) schließt inhaltlich direkt an die oben eingehend dargestellte an und schließt die nearktischen Taxa in dieses Artengruppen-Schema ein.

Dabei waren es die Arten *E. creusa* (Doubleday & Hewitson, 1847), *E. hyantis* (W.H. Edwards, 1871), *E. guaymasensis* Opler, 1986, *E. olympia* (W.H. Edwards, 1871), and *E. ausonides* (Lucas, 1852), die neben einigen strittigen (Sub-)Spezies in das bestehende System integriert wurden. Die Distanzanalyse mit einem an paläarktischen Arten verkürzten Datensatz lieferte wiederum den graphischen Nachweis der Artengruppen-Zuordnung. Es zeigte sich, dass vier der fünf Arten zu der Artengruppe II gehören, und nur eine Art, nämlich *E. ausonides* zur Artengruppe V. Um die Eigenständigkeit der nearktischen Arten innerhalb

dieser Artengruppen zu untersuchen, wurden die Distanzwerte gegeneinander geplottet. Für die Artengruppe II ergab sich daraus folgendes Bild:

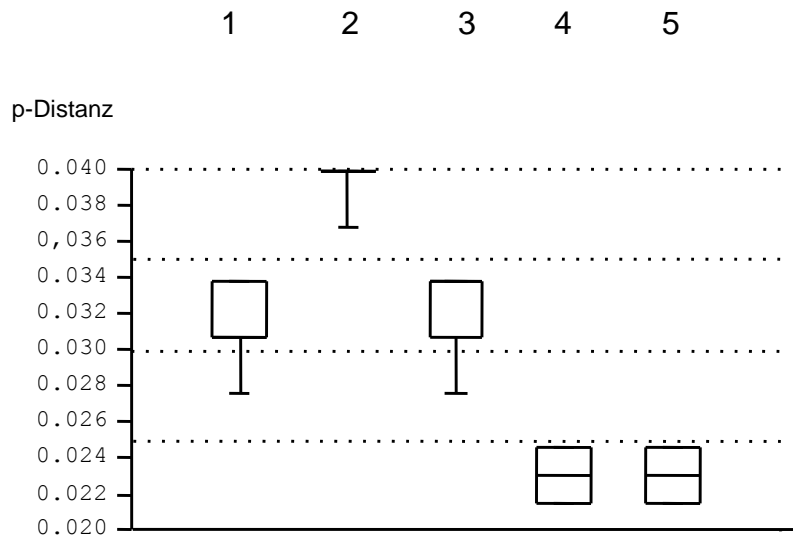


**Abbildung 12: Boxplots der genetischen Distanzen in der Artengruppe II von *Euchloe***

Box 1: *E. olympia* vs. *E. guaymasensis*; box 2: *E. olympia* vs. *E. creusa*, box 3: *E. olympia* vs. *E. hyantis*; box 4: *E. guaymasensis* vs. *E. creusa*; box 5: *E. guaymasensis* vs. *E. hyantis*; box 6: *E. creusa* vs. *E. hyantis*. **Aus:** Back, W., **Miller, M.A.** & Opler, P.A. (2011): Genetic, phenetic, and distributional relationships of Nearctic *Euchloe* (Pieridae: Lepidoptera). *Journal of the Lepidopterist's Society* 65 (1): 1-14.

Der genetische Abstand aller nearktischen Arten (*E. olympia*, *E. guaymasensis*, *E. hyantis* und *E. creusa*) zueinander ist weit über dem artabgrenzenden Grenzwert von 2%, sodaß diese Arten auch molekular als valide bestätigt wurden.

Ähnliches war der Fall in der Artengruppe V. Hier wurde die Validität der nearktischen Art *E. ausonides* bestätigt:



**Abbildung 13: Boxplots der genetischen Distanzen in der Artengruppe V von *Euchloe***

Box 1: *E. ausonides* vs. *E. ausonia*; box 2: *E. ausonides* vs. *E. simplonia*; box 3: *E. ausonides* vs. *E. persica*; box 4: *E. simplonia* vs. *E. ausonia*; box 5: *E. persica* vs. *E. ausonia*. **Aus:** Back, W., **Miller, M.A.** & Opler, P.A. (2011): Genetic, phenetic, and distributional relationships of Nearctic *Euchloe* (Pieridae: Lepidoptera). *Journal of the Lepidopterist's Society* 65 (1): 1-14.

Eine verwirrende Vielzahl von Unterarten taucht in der Amerikanischen Sekundärliteratur auf, die in der vorliegenden Analyse nur teilweise zu integrieren waren. Es scheint sich auch in Amerika um eine Momentaufnahme der Evolution in verschiedenen Stadien der Speziationsprozesse zu handeln, die mit den verwendeten molekularen Markern nicht eindeutig zu greifen sind. Dennoch wurde mit diesen Untersuchungen ein stabiles, über alle im Verbreitungsgebiet der Gattung rezent existierenden Arten und den meisten Unterarten identisches systematisches und damit auch taxonomisches Bewertungssystem gelegt, das nun als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen kann.

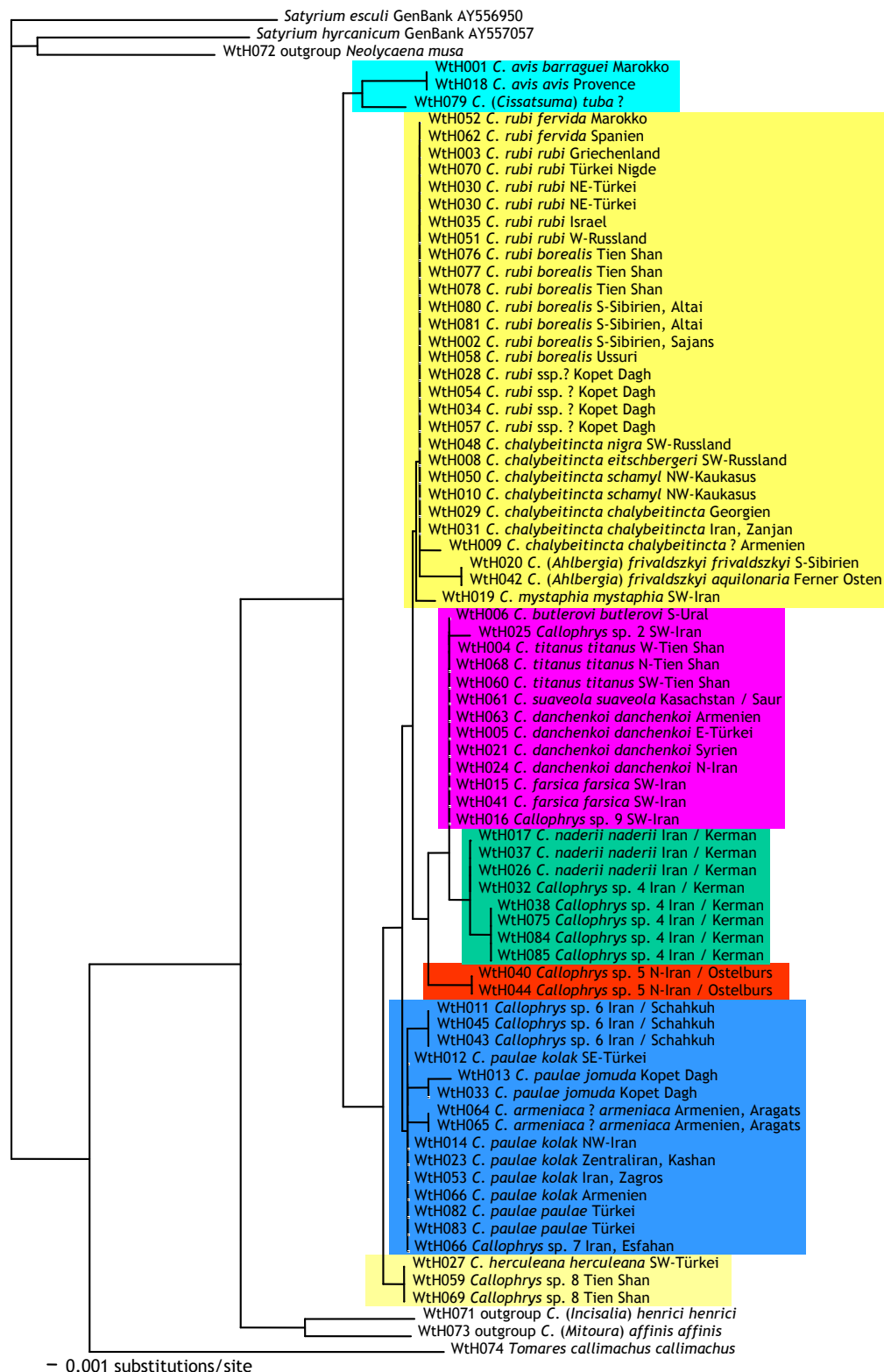
Die Lycaeniden-Gattung *Callophrys* wurde in einer Arbeit (ten Hagen & **Miller** 2010) untersucht, in der nur die paläarktischen Vertreter inkludiert waren. Die Problematik bei der Identifizierung der Taxa wird ausführlich behandelt. Auf die Assoziation paraphyletischer Artengruppen mit verschiedenen Pflanzenfamilien, die die Falter als Ruhestätten, manchmal auch als Eiablagepflanzen benutzen, wird insbesondere im Hinblick auf den Wert dieses Verhaltens als Determinationshilfe eingehend hingewiesen.

Die homologen 400bp des COI-Gens hatten relativ geringe Distanzwerte bei den paläarktischen Arten, nämlich  $p=0,0250$  zwischen *C. avis* und *C. naderii* bzw.  $p=0,0275$

zwischen *C. avis* und *C. sp. 4* aus Südiran. Auch die Distanzwerte zwischen den paläarktischen und den nearktischen Vertretern waren ähnlich gering. Die nächstverwandte Gattung *Tomares* Rambur, 1840 zeigte Distanzwerte von  $p=0,075$ , was wiederum annähernd so hoch ist, wie es vorher bei den Pierinae gefunden worden war.

Die Gattung *Ahlbergia* Bryk, 1946 hingegen, die als Schwestertaxon zu *Callophrys*, mindestens aber als Untergattung betrachtet wurde, kam in der Analyse nicht monophyletisch, sondern innerhalb der *Callophrys* heraus, womit dieser Gattungsname ein Synonym zu *Callophrys* ist.

Zur Verdeutlichung der in diesem Fall schwachen Auflösungskraft des COI-Abschnitts, aber auch der hier besser geeigneten Analyse mit dem NETWORK-Programm, sind nachfolgend beide Diagramme gegenübergestellt.

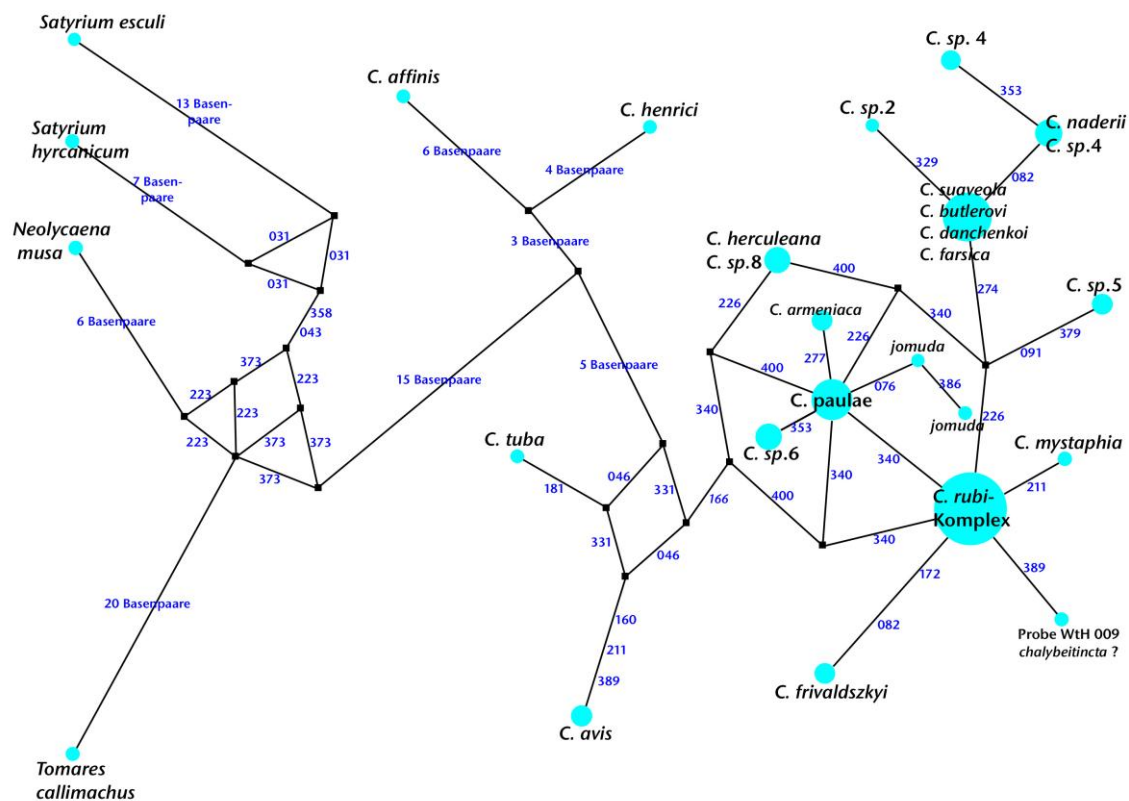


**Abbildung 14: NJ-Baum der Gattung *Callophrys* nebst Außengruppenvertretern**

Neighbour-joining-Analyse (NJ-tree) aus den genetischen Distanzen des eines mitochondrialen COI-Genabschnitts (400 bp) der untersuchten Taxa einschließlich der in der GenBank verfügbaren homologen DNA-Sequenzen von *Satyrium esculi* (HÜBNER, 1804) und *hyrcanicum* (RILEY, 1939). **Aus:** ten Hagen, W. & Miller, M.A. (2010): Molekulargenetische Untersuchungen der palaearktischen Arten des Genus *Callophrys* BILLBERG, 1820 mit Hilfe eines mtDNA-COI-Barcodes und taxonomische Überlegungen (Lepidoptera: Lycaenidae). Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo N.F. 30 (4): 177-197.

Es fällt die starke Haplotypen-Verarmung auf, was sich durch die vielen, auf einer Linie liegenden Proben zeigt (siehe Abb. 11). Offensichtlich verhält sich die molekulare Evolution des COI-Gens bei *Callophrys* anders als bei den Pierinae.

Zur besseren Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse wurde auch in dieser Arbeit auf die bereits vorgestellte Methode der Netzwerk-Darstellung der Haplotypen zurückgegriffen, die die Beziehungen der nahverwandten Haplotypen zueinander konkretisiert (siehe Abb. 12).



**Abbildung 15: Network-Analyse der untersuchten *Callophrys* und Außengruppen**

Die hellblauen, größeren Knoten sind die Haplotypen. Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der untersuchten Individuen mit identischer Gensequenz. Die kleinen, schwarzen Knoten sind von der Software konstruierte hypothetische Haplotypen, die zur Konstruktion des Netzwerks notwendig sind. Es sind Zwischenschritte der Evolution, die notwendig gewesen sein müssen, denen jedoch kein aktuell untersuchtes Individuum zugrunde liegt. Die dunkelblaue Zahl neben den Zweigen gibt das Basenpaar an, das in dem Mutationsschritt verändert wurde. Bei längeren Zweigen ist nur die Anzahl der Mutationen angegeben; auf die Angabe der einzelnen Basenpaare wurde verzichtet. **Aus:** – ten Hagen, W. & Miller, M.A. (2010): Molekulargenetische Untersuchungen der palaearktischen Arten des Genus *Callophrys* BILLBERG, 1820 mit Hilfe eines mtDNA-COI-Barcodes und taxonomische Überlegungen (Lepidoptera: Lycaenidae). Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo N.F. 30 (4): 177-197.



Die Interpretation der molekularen Ergebnisse ist keineswegs eindeutig und leicht, bringt aber im integrativen Zusammenspiel mit anderen Merkmalen der Falter, nämlich Phänologie, Genitalmorphologie, Biogeographie und Ökologie weiteren Erkenntnisgewinn. Hebert et al. (2003) und auch Hajibabaei et al. (2006) zeigten, daß für das von ihnen untersuchte Material ein kurzer „barcode“ von ca. 300 Basenpaaren (bp) des COI-Gens für die Artdetermination der überwiegenden Zahl der DNA-Proben ausreichend ist. Meier (2008) geht noch weiter und folgert, dass ab 300 bp aus längeren Sequenzen kein weiterer Erkenntnisgewinn zu erwarten ist. Die in der vorliegenden Studie erhaltenen Ergebnisse scheinen aber eher die Erfahrungen von Wiemers & Fiedler (2007) zu bestätigen (ähnlich unter anderem auch Hickerson et al. 2006, Lukhtanov & Shapoval 2008, Niehuis et al. 2007, Pons et al. 2006, Schmidt & Sperling 2008, Will et al. 2005, Will & Rubinoff 2004), die für das Genus/Subgenus *Agrodiaetus* (Lycaenidae) eine erhebliche Fehlerquote bei ausschließlicher Determination durch DNA-barcoding nachwiesen und die Berücksichtigung anderer Daten fordern. Deutliche Differenzen in der DNA deuten auf versteckte Arten („cryptic species“) hin, gleiche DNA-Sequenzen treten jedoch auch bei gut differenzierten, näher verwandten Taxa auf. Dies könnte eine genetische Besonderheit bei den Lycaeniden darstellen, deren evolutiver Ursprung weiter untersucht werden sollte.

Die Analyse der Schwimmkäfer der Gattung *Rhantus* (Balke, ... , **Miller**, M. A., 2009) brachte eine gut aufgelöste und stabile Phylogenie auf Art- und Populationsniveau, und zwar genauso mit Parsimonieverfahren als auch mit Bayesianischer Analyse. Auch hier, wie schon in der *Themira*-Arbeit, waren es die proteincodierenden mitochondrialen Gene, die am meisten zur Auflösung und phylogenetischem Signal beitrugen. Tatsächlich betrug der normalisierte PBS für die nDNA 0,047, für die mtDNA hingegen 0,086, also fast das Doppelte. Die verschiedenen Auswertungsmethoden und Bewertungen der Datensätze, kombiniert oder einzeln betrachtet, ergaben weitestgehend identische Topologien.

Das Phylogramm der kombinierten Datensätze ist in Abb. 13 dargestellt.

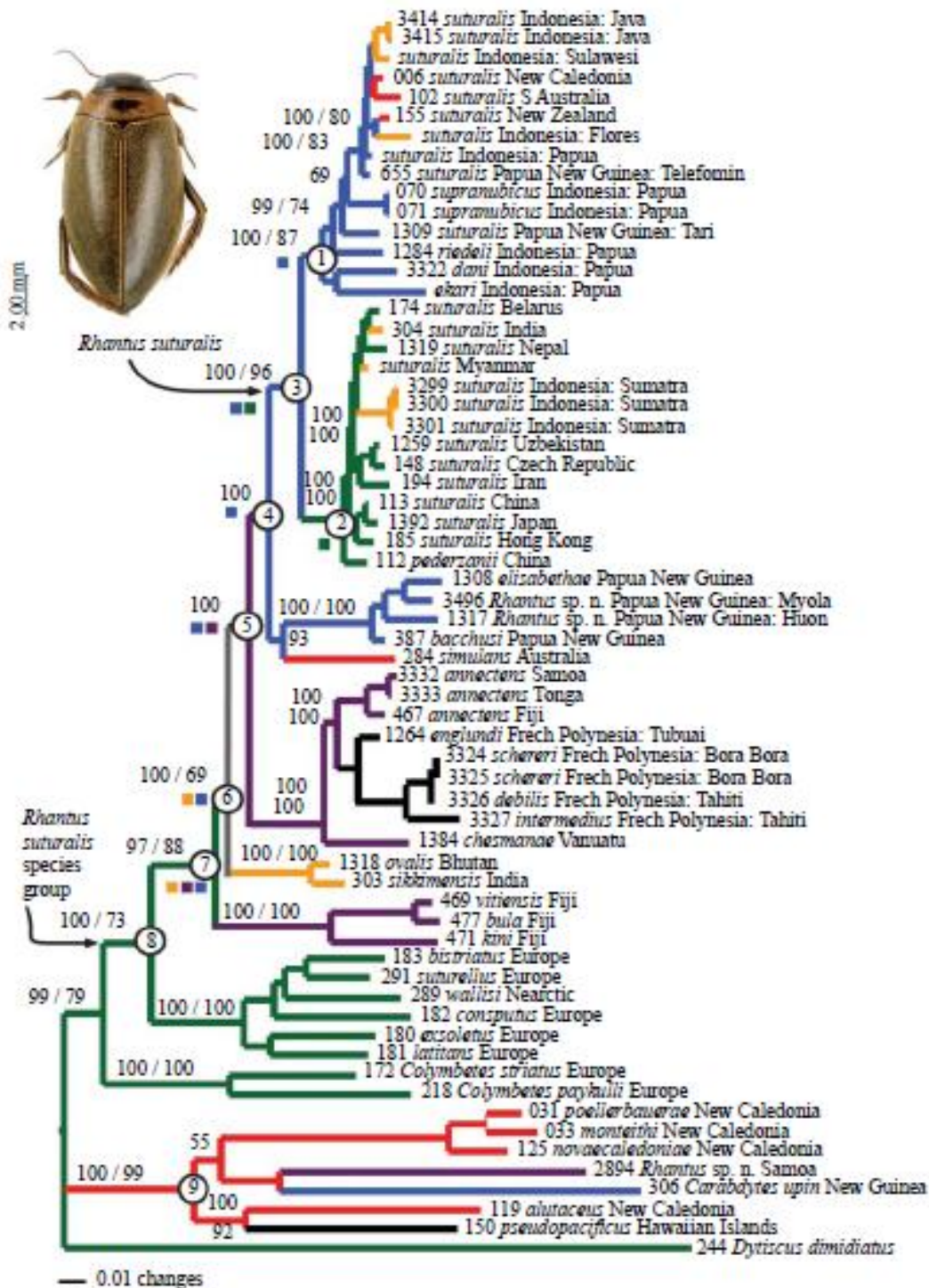


Abbildung 16: Phylogenie der Gattung *Rhantus*

Phylogramm der Bayesianischen Analyse mit nach Genorten partitionierten Datensätzen. Die Zahlen in den Kreisen beziehen sich auf wichtige Verzweigungen, die Zahlen über den Verzweigungen sind Bayesian PP (x100)/ML bootstrap – Werte, erhalten von der GARLI-Analyse, angegeben für alle kritischen Verzweigungen (falls nur eine Zahl angegeben ist, ist dies der Bayesianische PP-Wert). Die Zweigfarben kennzeichnen Verbreitungsgebiete: orange: Orientalis; blau: Neuguinea; rot: Australien, Neuseeland und Neukaledonien; lila: Melanesien; schwarz: Ozeanien (Polynesien); grün: Holarktis. Die erweiterte Zweigfärbung stammt von der Parsimonie-Optimierung durch MACCLADE. Bunte Quadrate an den Verzweigungen deuten auf ancestrale Verbreitungen hin, wobei dieselben Farbcodes verwendet wurden (errechnet mit DIVA). **Aus:** Balke, M., Ribera, I. **Miller, M.A.,** Hendrich, L., Sagata, K., Posman, A., Vogler, A. P. & Meier, R. (2009): New Guinea highland origin of a widespread arthropod supertramp. Proc. R. Soc. B. 276: 2359-2367.

Die *R. suturalis* – Artengruppe war monophyletisch, wobei *R. suturalis* selbst in einer Gruppe clustert, die aus lokalen Endemiten aus Neuguinea und Australo-Ozeanischen Arten besteht (Verzweigung 8). Es ergaben sich zwei unterschiedliche Linien, eine Asiatisch/Paläarktische und eine Australisch/Melanesische, wobei innerhalb dieser Linien die Sequenzdivergenz selbst über sehr große Distanzen der Fundorte relativ gering war. Beispielsweise unterschieden sich im COI-Gen Tiere aus Tschechien und Sumatra um 2,42%, waren aber ca. 9.500km voneinander entfernt gesammelt worden. Auch die Tiere von Belarus und Indien, 5.000km voneinander entfernt, unterschieden sich nur um 0,42%.

Eine Gruppe von Arten aus Neuguinea mit dem endemischen *R. suturalis* aus Südwest-Australien war basal, gefolgt von einem Zweig von Melanesischen + Polynesischen Arten (Verzweigung 5), einem Zweig mit zwei Orientalis- (Verzweigung 6) und einem Zweig mit Fidschi-Arten (Verzweigung 7). Holarktische Vertreter der *suturalis*-Gruppe und die holarktische Gattung *Colymbetes* waren Schwestergruppen zu allen diesen Zweigen. Einige andere endemische *Rhantus*-Arten aus Ozeanien und der *C. upin* aus Neuguinea kamen in einem stark unterstützten Zweig heraus, im Schwestergruppenverhältnis zu den übrigen Colymbetini (Verzweigung 9).

Die biogeographische Rekonstruktion verortete den Ursprung von *R. suturalis* oder seinem Vorfahren in die Hochebenen von Neuguinea, von wo aus sich die Arten weit in die Alte Welt verbreiteten. Eine zweite Wanderwelle zurück führte auf die Indonesischen Inseln, ausgehend von Eurasien und Australien. Die Australasiatische/Ozeanische Region wurde von der *suturalis*-Gruppe von Eurasien aus besiedelt (Verzweigung 6 und 7). Auf weitere Verbreitungs- und Besiedlungsszenarien sei an dieser Stelle nicht weiter eingegangen, sondern auf den Appendix verwiesen.

*Rhantus suturalis* ist somit ein weitverbreiteter ökologisch sehr anpassungsfähiger und mobiler Schwimmkäfer, der sich schnell verbreitet und dabei auch Grenzen überschritten hat, die für andere Organismen als unüberwindbare Barrieren gelten, wie die Wallace-Linie. Er wurde nie sympatrisch mit seinen Nächstverwandten gefunden, wohl aber syntop mit eher entfernt verwandten Arten wie *R. bacchusi* und *R. elisabethae* (Verzweigung 4). Die nahe verwandten Taxa unterscheiden sich deutlich im männlichen Genital, was die reproduktive Isolation der Endemiten noch verstärkt und als Mechanismus der Speziation gelten kann.

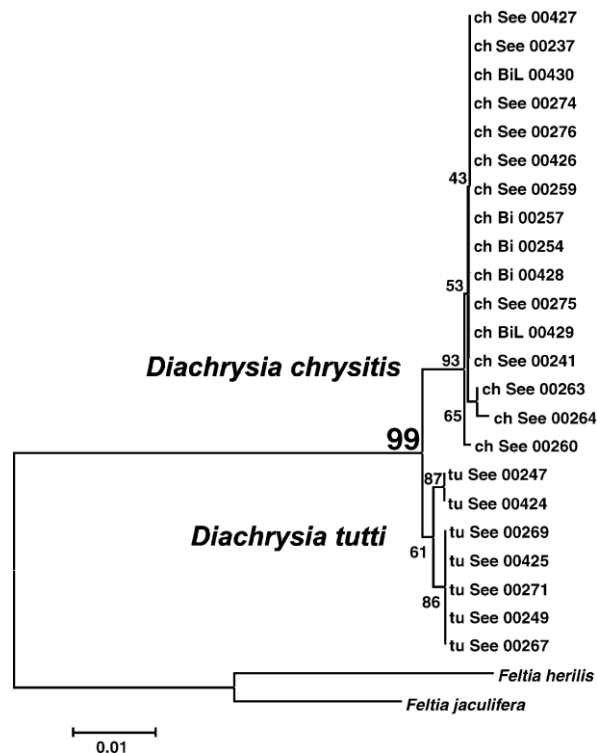
Traditionell war die Systematik der Auffassung, dass die *R. suturalis* – Artengruppe von Eurasien aus unidirektional über die Wallace-Linie Melanesien und die Australisch-Polynesische Region besiedelte, mit nachfolgender Diversifizierung in viele endemische Arten. Diese etwa 25 Endemiten sind teilweise recht häufig und ein wichtiger Bestandteil der Melanesischen und Ozeanischen Süßwasser-Ökosysteme. *Rhantus suturalis* ist die einzige

Art der Gattung in Australien und der Mehrheit des Malayischen Archipels zwischen Asien und Neuguinea/Australien. Die Inseln mit weitläufigen Hochebenen wie Sulawesi, Java, Borneo, Lombok, Flores und Timor beherbergen ebenfalls nur diese eine Art. Die genetischen Befunde legen derzeit nahe, dass die Besiedlung dieser Gebiete erst vor einigen hunderttausend Jahren erfolgte, wodurch noch keine Diversifizierung und Fixierung von Merkmalen einzelner Populationen eines Gebiets erfolgen konnte, oder der Genfluss ist entgegen der großen Distanzen der einzelnen Populationen zueinander unerwartet hoch.

In dieser Arbeit wird deutlich, dass die DNA-Taxonomie zwar die Bestimmung und Identifizierung von Arten ermöglicht, wenn entsprechend variable Genorte zur Definition der Taxa gewählt werden, aber auch die Problematik der Biogeographie und Entstehungs- und Besiedlungsgeschichte der Taxa, die weitaus komplexer ist als früher angenommen. Die überraschende morphologische Ähnlichkeit zwischen den Populationen von *R. suturalis* und das Fehlen von regionaler ökologischer Spezialisierung unterstützt die Wahrnehmung dieses Taxons als nur eine, morphologisch gut definierte paraphyletische Art. Auf der anderen Seite gibt es genetisch fixierte Unterschiede, vor allem im EF-1 $\alpha$ , die auch die Interpretation des Taxons als zwei phylogenetische Arten zulassen (*sensu* Wheeler & Platnick (in: Wheeler & Meier 2000)).

#### **4.5 Identifikationen**

Die Ergebnisse der Untersuchung von zwei verschiedenen Pheromotypen von Messingeulen (Hille, **Miller** & Erlacher 2005) stützen sich auf die Analyse von 23 Probestieren, die aus Bielefelder und Seewiesener Fallenfängen stammten. Es ergaben sich jeweils 709 bp für die Vergleichsanalysen, von denen neun variabel (1,27%) und fünf davon Parsimonie-informativ waren und einen Aminosäureaustausch zwischen den Linien bewirkten. Die nachfolgende Grafik zeigt die deutliche Clusterung der beiden Pheromotypen und die hohe Bootstrap-Unterstützung des Knotens mit 99% (siehe Abb. 17):



**Abbildung 17: NJ – Analyse der genetischen Distanzen von *D. tutti* und *D. chrysitis***

Die Abkürzungen „tu“ bedeuten Pheromotype *tutti*, „ch“ bedeutet Pheromotype *chrysitis*, „Bi“ steht für Fundort Bielefeld, „See“ für Fundort Seewiesen. Als Außengruppen dienten die homologen Sequenzen von *Feltia herilis* und *F. jaculifera*. **Aus:** Hille, A., **Miller, M.A.**, Erlacher, S. (2005): DNA sequence variation at the mitochondrial cytochrome oxidase I subunit among pheromotypes of the sibling taxa *Diachrysia chrysitis* and *D. tutti* (Lepidoptera: Noctuidae). *Zoologica Scripta* 34: 49-56.

Somit entsprachen alle in den spezifischen Fallentypen gefangenen Pheromotypen einem spezifischen Haplotypencluster, unabhängig vom Fundort ihres Populationssamples. Besonders interessant war nun die vergleichende Bestimmung der Probeniere nach morphologischen Kriterien, die dankenswerterweise Herr Dr. Ladislaus Rezbanyai-Rezer übernahm. Das Ergebnis war, dass in 14 der 23 Proben (60%) die morphologische Bestimmung NICHT mit den molekularen und pheromongestützten Determinationen übereinstimmte, die Pheromotypen und die molekularen Merkmale aber 100% Übereinstimmung zeigten. Somit konnte eindrucksvoll gezeigt werden, welche neuen Erkenntnisse mit der hochpräzisen DNA-Analyse gewonnen werden können, die hier sogar in der Lage war, Arten in *statu nascenti* genauestens zu detektieren.

Die Identifikation der bislang unbekanntes Larvenstadien der Prachtlibellenart *Polythore spaeteri* mit DNA-Sequenzanalyse war das Ziel der Arbeit von Etscher, **Miller & Burmeister** 2006 (siehe Anhang). Es wurden drei Imagines und drei angenommene Larven von *P. spaeteri* molekular untersucht, dazu eine *Calopteryx splendens* als Außengruppe. Dieses Taxon ist zwar als Angehöriger der Familie Calopterygidae eher entfernt verwandt mit der

Familie Polythoridae, beide gehören aber zur Überfamilie Calopterygoidea. Zum Untersuchungszeitpunkt lag kein Material von nächstehenden Außengruppenvertretern vor.

Proben- ID	Basen- position	Positionen der divergierenden Nukleotide auf dem COI-Gen																	
		7	7	8	9	9	9	9	9	9	9	1	1	1	1	1	1	1	1
		9	9	0	8	8	8	9	9	9	6	6	6	6	6	6	8	8	8
		8	9	0	5	6	7	6	7	8	4	5	6	5	6	7	0	1	3
	Codon position	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
DNATAX02710	<i>P. spaeteri</i> -Imagines	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
DNATAX02711		<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
DNATAX02713		<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>
p-Distanz der Imagines		<b>0,25%</b>																	
DNATAX02714	<i>P. spaeteri</i> - Larven	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>
DNATAX02716		<b>G</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>
DNATAX02718		<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>
p-Distanzen der Larven		<b>0,38%</b>																	
p-Distanzen der Imagines und Larven gesamt		<b>0,76%</b>																	
kodierte Aminosäure		Gly			Leu			Ser			Gly			Leu			Ile		

**Abbildung 18: Tabelle der variablen Sequenzpositionen bei *Polythore spaeteri*.**

Zur Außengruppe *Calopteryx splendens* wiesen die Proben von *Polythore spaeteri* 18 divergierenden Positionen auf dem untersuchten Sequenzabschnitt des COI-Gens auf ( $p=22,4\%$ ). Innerhalb dieser variablen Positionen gab es innerartliche Varianz an einigen Positionen. Die Stellen sind durch Fettdruck kennbar gemacht. Die Abkürzungen der Aminosäuren bedeuten: Gly: Glycin, Leu: Leucin, Ser: Serin, Ile: Isoleucin. **Aus:** Etscher, V., **Miller, M.A.** & Burmeister, E.-G. (2006): The larva of *Polythore spaeteri* Burmeister&Börzsöny with comparison to other polythorid larvae and molecular species assignment (Zygoptera: Polythoridae). Odonatologica 35 (2): 127-142, verändert.

Die erhaltenen Sequenzen des COI-Gens waren jeweils 790bp lang. Die Sequenzdivergenzen zwischen den Imagines lag bei 0,38%, die der Larven untereinander bei 0,25%. Die Gesamtdivergenz der Larven und Imagines war 0,76%. Der genetische Abstand zur Außengruppe lag bei 22,4%. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Proben einen Querschnitt durch die gesamte Population darstellen, da Larven und Imagines an denselben beiden Tagen gesammelt worden waren und die Imagines aufgrund der Lebensspanne und der Dauer des typischen Entwicklungszyklus bei Prachtlibellen nicht die Eltern der Larven gewesen sein können. Zudem liegt dieser Grad der Sequenzdivergenz im typischen Bereich für Populationen und die Larve-Imago – Zuordnung war erfolgreich. Durch diese Verifizierung der Artzugehörigkeit konnten nun weitere morphologische Merkmale (Lichtmikroskop, REM) der Larven erhoben und dargestellt werden. Sie stellen somit die erste Beschreibung eines Larvenstadiums innerhalb der Gattung *Polythore* dar.

Ebenfalls sehr interessant waren die Ergebnisse der Untersuchung der *subaptera*-Artengruppe der Schaben (Knebelberger & Miller 2007). Wie bereits erwähnt, tritt hier bei einigen Arten und Populationen Parthenogenese auf. Deshalb sollte eine tiefgründige Untersuchung Aufschluss über die Populationsstrukturen einer Artengruppe geben und darüber, ob Parthenogenese obligat oder fakultativ auftritt, vielleicht sogar umweltbedingt gewechselt werden kann. Zunächst wurde die von Rambour 1838 aus Andalusien beschriebene Art *Phyllodromica subaptera* wiederbeschrieben und mit einer DNA-Kennsequenz versehen. Die Abgrenzung von weiblichen Tieren der Art *P.iberica* und den parthenogenetischen Weibchen von *P. subaptera* ist morphologisch nicht möglich, weshalb sich die Artabgrenzung bei diesem Artenpaar/dieser Konstellation hauptsächlich auf molekulare Daten stützt.

Ausgehend von dieser Festlegung wurden die weiteren Morphen morphologisch und molekular abgegrenzt. Zuerst wurde *Phyllodromica iberica* Knebelberger & Miller, 2007 abgetrennt. Dabei handelt es sich um eine sexuelle Art mit Hauptverbreitung auf der Iberischen Halbinsel. Drei Morphen konnten unterschieden werden: Morphe 1 war bei zwei Paratypen und 1597 bp COI mit up- und downstream-Region molekular identisch, Morphe 2 hatte bei den beiden Vergleichstieren nur ein Basenpaar Unterschied, die beiden Vergleichstiere der Morphe 3 bargen auf derselben Sequenzlänge gerade sechs variable Positionen (0,38% Sequenzdivergenz). Interessanterweise barg diese Morphe auch morphologisch die größte Variabilität der Merkmale im Vergleich zu den anderen beiden, kaum variablen Morphotypen.

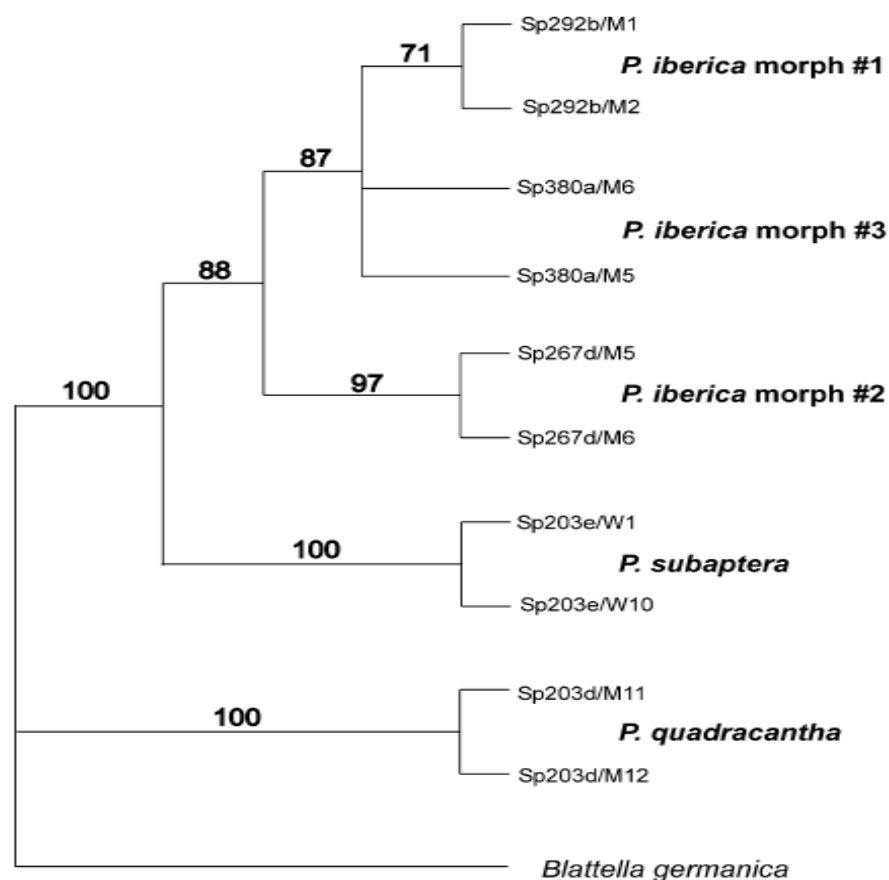
Die zweite, gut abtrennbare Art wurde als *Phyllodromica quadracantha* Knebelberger & Miller, 2007 beschrieben. Diese ebenfalls bisexuelle Art besiedelt ein relativ kleines Verbreitungsgebiet in Südost-Spanien, abgetrennt von anderen bisexuellen Arten, erscheint aber nur in einer Morphe.

Die genetischen Distanzen zwischen der Außengruppe *Blatella germanica* und der *subaptera*-Artengruppe betrug zwischen 15,31% und 16,07%, ein Wert, der nahe der Sättigung liegt. Die höchste Sequenzdivergenz fand sich zwischen *P. quadracantha* und dem Artenpaar *P. subaptera* und *P. iberica* (8,86% bis 9,11%). Dieser sehr hohe Wert spiegelt die lange bestehende reproduktive Isolation dieser nächstverwandten Arten wider. Weitaus jünger ist die Artaufspaltung zwischen der parthenogenetischen *P. subaptera* und der bisexuellen *P. iberica* (1,75%-1,85%). Dieser Wert wird allgemein als untere Grenze von anerkannt eigenständigen Arten betrachtet. Im vorliegenden Fall wird diese Ableitung aber zusätzlich durch die Tatsache gestützt, dass die obligat thelytok parthenogenetischen *P. subaptera* eine Kreuzungsbarriere zu den obligat sexuellen *P. iberica* aufweisen. Da eine sehr große, zusammenhängende Sequenzlänge des Mitochondriums zu Vergleichszwecken erhoben worden war, konnten die arttypischen Basenpositionen, also diejenigen mit

phylogenetischem Gehalt und Parsimonieinformation unterschieden werden von den spontanen Punktmutationen ohne Identifizierungscharakter.

Die intraspezifischen Sequenzdivergenzen schwankten zwischen 0,06% und 1,21%, wobei die am weitesten entfernt verwandte Art *P. quadracantha* auch die höchsten Werte aufwies. Dennoch erlauben die artspezifischen variablen Positionen in jedem Fall eine sichere Determination der Arten mittels DNA-Analyse.

Die phylogenetische Auswertung der DNA-Sequenzdaten (siehe Abb. 15) ergab die vorhersehbar eindeutige Gruppierung der drei Arten zu monophyletische Einheiten der sequenzierten Individuen.



**Abbildung 19: Strikter Konsensusbaum der *Phyllodromica subaptera*-Artengruppe**

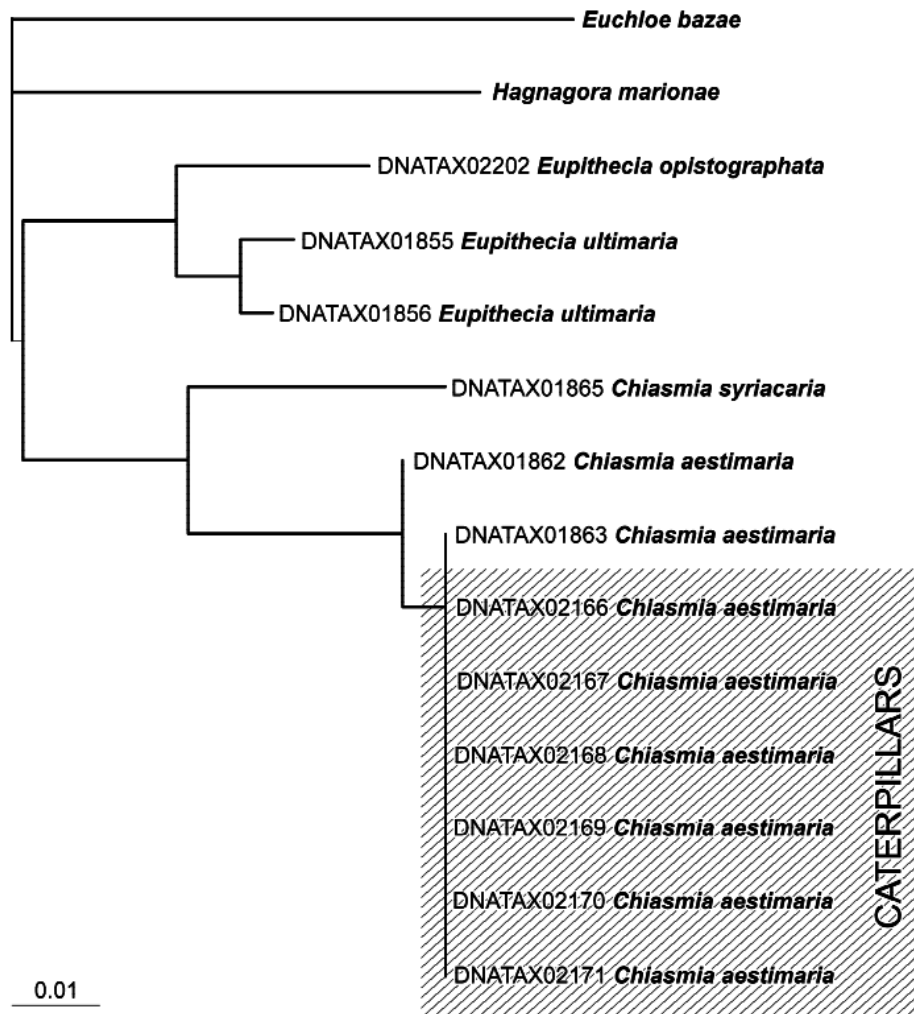
Ergebnis der Sparsamkeitsanalyse (MP). Der Baum hat eine Länge von 374 Schritten, CI = 0,94, RI = 0,90. Es sind nur Bootstrap-Werte über 50 angezeigt. Die Analyse wurde mit 2000 Replikaten durchgeführt. *Blattella germanica* wurde als Außengruppe definiert. **Aus:** Kneibelsberger, T. & Miller, M.A. (2007): Revision and phylogeny of the *subaptera*-group of *Phyllodromica* (Blattoptera: Blattellidae: Ectobiinae), including a parthenogenetic species and the evaluation of COI sequences for species identification (DNA barcoding). *Zootaxa* 1522: 1–68.



Basal steht dabei *P. quadracantha*, abgeleitet die beiden Schwesterarten *P. subaptera* und *P. iberica*. Diese beiden Arten unterscheiden sich in den akkumulierten Sequenzdivergenzen so deutlich voneinander, dass eine Hybridisierung in der Natur ausgeschlossen werden kann. In diesem Fall einer Gruppe sehr nahe verwandter Arten bewies das COI-Gen wiederum nicht nur seine große Qualität als Identifizierungswerkzeug für die Arten, sondern zusätzlich auch seine Brauchbarkeit als phylogenetischer Marker, wo die morphologischen Merkmale durch das Fehlen der Männchen und der Merkmalsidentität der (parthenogenetischen) Weibchen bei zwei Arten keine Auflösung ermöglicht.

#### **4.6 Ökologische Anwendungen**

Die Resultate bei **Miller** et al. 2006 basieren auf einem homologen DNA-Sequenzabschnitt von 205 Basenpaaren, der für alle Proben generiert werden konnte. Dabei ging es zuerst um die Zuordnung der Raupen zu den eindeutig identifizierten Imagines der in Frage kommenden Arten. Bei den Imagines wurden zwei verschiedene Haplotypen der Art *Eupithecia ultimaria* gefunden, bei *Chiasmia aestimaria* waren es ebenfalls zwei Haplotypen. Die anderen Arten (*Eupithecia opithographata* und *Chiasmia syriacaria*) waren nur in einem Exemplar sequenziert worden. Die unbekanntes Raupen ergaben alle denselben Haplotyp, obwohl sie morphologisch in zwei verschiedene Morphospezies unterteilt werden konnten. Genauere Untersuchungen ergaben hingegen, dass zwei verschiedene Larvenstadien vorlagen, die sich morphologisch stark unterschieden. Das Clustering zu der korrekten Art zeigte mehr als eindeutig in der UPGMA-Analyse (siehe Abb. 16):



**Abbildung 20: Distanzbaum (UPGMA) der untersuchten Raupen und der Referenztaxa**

Alle bis dahin unbekanntes Raupen gruppieren sich zu einem Haplotyp der Art *C. aestimaria*. Als Außengruppen wurden weit entfernte Verwandte (Taxa) (*Euchloe bazae* (Pieridae: Pierinae) und *Hagnagora marionae* (Geometridae: Larentiinae)) gewählt. Aus: **Miller, M.A.**, Müller, G.C., Kravchenko, V.D., Junnila, A., Vernon, K.K., Matheson, C. D. & Hausmann, A. (2006): DNA-based identification of Lepidoptera larvae and plant meals from their gut content. Russian Entomological Journal 15 (4), 427-432.

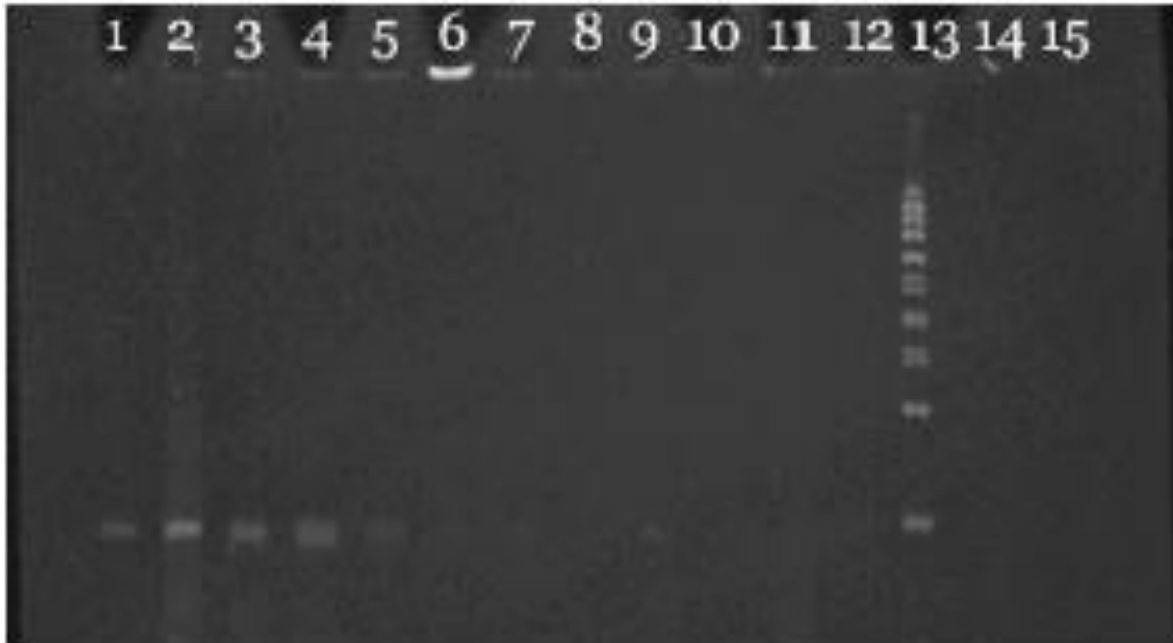
Eine weitere Untersuchung der Sequenzdivergenz auf der gesamten Länge von 1560bp ergab den Wert von  $p=0,0064$ , also weniger als einem Prozent. Wie bereits für Pieriden gezeigt, ist auch bei Geometriden die Artgrenze im Bereich von 2% Sequenzdivergenz anzusiedeln. Demnach liegt dieser Sequenzdivergenzwert innerhalb des für innerartliche Populationsvarianz typischen Bereiches. Damit konnte einerseits die Identifikationsqualität der molekulargenetischen integrativen DNA-Taxonomie gezeigt werden. Andererseits sollte noch die Analyse des Darminhalts der bereits zoologisch untersuchten Larven folgen. Hier ergab sich, nach der Sequenzierung eines kurzen Stückes (153bp) des Chloroplasten-Gens *rbcl*, bei der BLAST-Suche in GenBank eine 100%ige Übereinstimmung mit *Tamarix nilotica* (GenBank-Eintragsnummer AY545896). Dennoch ist zu erwarten, dass dieses kurze

Fragment des *rbcl*-Gens nicht ausreichen wird, um in jedem Fall die im Darm von pflanzenfressenden Insekten gefundene DNA eindeutig einer Pflanzenart zuzuordnen zu können. Dazu ist die Auflösungskraft auf diesem Teilstück zu gering.

Um den Effekt, wie die DNA-Sequenzlänge den Identifikationserfolg auch auf der Nahrungspflanzenseite beeinflusst, genauer zu untersuchen, wurde bei einer weiteren Studie (Matheson, Müller, Junnila, Vernon, Hausmann, **Miller**, Greenblatt, & Schlein 2008) eine erweiterte Anzahl von Futterpflanzenarten auf ihre Abgrenzbarkeit im *rbcl*-Gen einbezogen. Die reine Sequenzlänge blieb dabei dieselbe, um zunächst nur einen Parameter zu verändern. Parallel wurde sowohl der präparierte Darminhalt als auch die organische Futterpflanze in den DNA-Extraktionsprozess, die PCR und Sequenzierung eingeschleust und Referenzsequenzen dieses Fragments generiert. Bei 23 von 24 Sequenzen ergab die BLAST-Suche, dass das hochgeladene *rbcl*-Gen noch nicht in GenBank vorhanden war, es also die erste Eingabe dieser Pflanzenart mit diesem Gen in GenBank war. Obwohl in dem einzigen Fall, in dem eine Zuordnung zu bereits hinterlegten Sequenzen gefunden wurde, die betreffenden Referenzsequenzen von komplett verschiedenen Pflanzenarten stammten, so waren doch alle anderen DNA-Sequenzen einzigartig und noch nicht hinterlegt.

Genauso wurde mit den *rbcl*-Sequenzen verfahren, die aus den Darminhaltsproben der untersuchten Insekten stammten. Auch in diesem Fall waren die selbst generierten Vergleichsequenzen der Jordantal-Pflanzengemeinschaften am wenigsten unterschiedlich zu den andern in GenBank hinterlegten Sequenzen, bis auf o.g. Ausnahme. Pflanzenarten mit sehr ähnlichen Sequenzen konnten für das Jordantal aufgrund ihres abweichenden Verbreitungsgebietes ausgeschlossen werden.

Die Größe der untersuchten Tiere spielte beim PCR-Erfolg weit weniger eine Rolle als die Verweildauer des Nahrungsbreies im Darm. Hier konnte eine annähernd lineare Abnahme des PCR-Produktgehalts mit dem Zeitpunkt der Probenahme nach der Nahrungsaufnahme (0-12h) hergestellt werden.



**Abbildung 21: Abhängigkeit der Detektionserfolges von der Ingestionsdauer.**

Qualitative und quantitative Unterschiede bei der PCR-Detektion des *rbcL*-Gens aus Mageninhaltsanalysen bei Insekten nach unterschiedlich langen Verweilzeiten im Darm. Spuren 1-8: Grillen und die Verdauezeit, Spuren 9-12: andere Insekten nach 4 Stunden Verdauezeit. Spur 1: 0 Stunden. Spur 2: 2 Stunden. Spur 3: 4 Stunden. Spur 4: 6 Stunden. Spur 5: 8 Stunden. Spur 6: 10 Stunden. Spur 7: 12 Stunden. Spur 8: ungefüttete Negativkontrolle. Spur 9: Raupe. Spur 10: Heuschrecke. Spur 11: Blattlaus. Spur 12: Zikade. Spur 13: DNA-Leiter. Spur 14: Negativkontrolle der Extraktion. Spur 15: PCR-Nullprobe. **Aus:** Matheson, C.D., Müller, G.C., Junnila, A., Vernon, K., Hausmann, A., **Miller, M.A.**, Greenblatt, C. and Schlein, Y. (2008): A PCR method for detection of plant meals from the guts of insects. *Organisms, Diversity & Evolution* 7: 294-303.

Auch hier zeigt sich wieder die Notwendigkeit einer Referenzdatenbank für *rbcL*-Sequenzen, wenn eine lokal begrenztes Untersuchungsgebiet beprobt werden soll. Es besteht die Gefahr, dass die öffentlich zugänglichen Datenbanken immer noch nicht spezifisch genug die Pflanzengesellschaft eines bestimmten Untersuchungsgebietes repräsentieren können. Auch allelische Polymorphismen, wie beispielsweise bei *Vitis* spp. gefunden, mögen noch nicht in den Datenbanken repräsentiert sein und beeinträchtigen die Treffergenauigkeit.

Ein weiterer Punkt, der zu untersuchen lohnenswert wäre, ist der von manchen Autoren postulierte und auch dokumentierte Polyphagismus verschiedener Insektenarten. Bei Larvenstadien eher unwahrscheinlich, ist es doch bei Imagines durchaus bekannt, dass verschiedene Futterpflanzen in kurzer Zeit hintereinander konsumiert werden, der Nahrungsbrei im Darm sich infolgedessen vermischt und eine eindeutige *rbcL*-Sequenz nicht mehr zu generieren ist. In diesem Fall muss auf aufwendigere Formen der Genanalyse zurückgegriffen werden, wie dies beispielsweise das Klonieren darstellt. Damit sollte sich das aufgenommene Nahrungsspektrum eindeutig nachweisen lassen.

Im vorliegenden Fall wurde gezielt ein kurzes Fragment des *rbcL*-Gens ausgewählt und verwendet, um den Effekt, den die Degradierung der DNA im Darm durch Hydro- und Autolyse bewirkt, auszuspielen und ein identisches DNA-Sequenzmuster für alle

Pflanzenproben zu erhalten. An dieser Stelle könnten Methodenverfeinerungen ansetzen, wie auch bei der Verwendung von zusätzlichen DNA-Markern, die schneller evolvieren und damit die Auflösungskraft erhöhen, womit die Präzision der Futterpflanzendetektion gesteigert wird. Diese neuartigen Methoden könnten ihre Anwendung in der (Forst-)Wirtschaft finden, aber auch in der Wissenschaft neue Erkenntnisse bei der Untersuchung von Biozönosen diverser Habitats und der Ontogenese phytophager Arten erbringen.

## 5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, wie der integrierte Ansatz der DNA-Taxonomie bei Insekten umgesetzt werden kann. Erstmals werden hier Methoden und Vorgehensweisen vorgestellt, die ein umfassendes Wissen über die untersuchten Taxa in deren Erstbeschreibung und phylogenetische Analyse einbringen und deshalb taxonomischen "Mehrwert" im Sinne von Tautz et al. (2003) bedeuten.

Die präparative Untersuchung des Genitals bei Insekten bedeutet oftmals einen teilweisen Verlust des Abdomens. Wie dieses Gewebe zum Zweck der DNA-Extraktion in Kombination beider Verfahren routinemäßig weiterverwendet werden kann, wird bei Knölke, Erlacher, Hausmann, **Miller** & Segerer (2005) dargestellt.

Die Sensitivitätsanalyse identifiziert die optimalen Analysebedingungen eines DNA-Sequenzdatensatzes. Beim *Themira*-Datensatz (Laamanen, Meier, **Miller**, Hille & Wiegmann 2005) ist die manuelle Alignierung der Sequenzen der computergestützten überlegen, Indels wurden als fünftes Merkmal gewertet, um damit den Stammbaum in maximalem Maß mit hohen Werten zu unterstützen, und nur Transitionen, nicht aber dritte Positionen müssen abgewertet werden, um dies zu erreichen. Es ist in jedem Fall unabdingbar, die Analyseparameter für jeden aus mehreren Genen bestehenden Datensatz neu herauszuarbeiten. Dazu erwies sich die Sensitivitätsanalyse als ein ideal geeignetes Werkzeug.

Die originäre Einbeziehung von Sequenzdaten in Artneubeschreibungen wird in dieser Arbeit als konsequente Weiterentwicklung anhand mehrerer Beispiele exemplarisch dargestellt und als zukünftiger Standard gefordert. Sie ist wenig aufwendig und bietet sich an, um ein objektives Identifizierungsmerkmal zu erhalten, das nachfolgend auch automatisierte Identifikationen ermöglicht. Bei der Erstbeschreibung von *Paracymoriza naumanniella* Buchsbaum, Speidel & **Miller**, 2004 wurden die ersten DNA-Sequenzen überhaupt innerhalb der Familie Crambidae erhoben. Bei der Erstbeschreibung von *Idaea nigra* Hausmann & Bläsius, 2007 (Hausmann, **Miller**, Leipnitz & Bläsius 2007) konnte die neue Art mit vielen biologischen Eigenschaften charakterisiert werden, ohne die Autorenschaft des neuen Taxons unübersichtlich werden zu lassen.

Bei der Erstbeschreibung von *Colias jomooseri* und *Colias wernerbacki* (**Miller** 2009) wurde durch die Veröffentlichung von vier verschiedenen *loci* eine weitere Forderung der DNA-Taxonomie umgesetzt, wonach eine biologischen Art mit mehreren unabhängigen genetischen Markern definiert werden muss. In diesem Fall wurden insgesamt 1244 bzw. 2854bp DNA-Sequenzinformation als Artdiagnose verfügbar.

Bei den phylogenetischen Analysen einzelner höherer Taxa (*Anthocharis*, *Elphinstonia*, *Euchloe*) zeigte sich die Sensitivität der molekularen Methode. Daraufhin muss auch die Auswertung der Sequenzdaten ausgerichtet sein. War es bei der Untersuchung von Unterarten und Populationen mit der Netzwerkanalyse möglich, die Resultate zu veranschaulichen (Back, Knebelsberger & **Miller** 2006a), kam bei Gattungsanalysen (Back, Knebelsberger, & **Miller** 2006b, 2008; Back, **Miller** & Opler 2011) die Darstellung der genetischen Distanzen als Baumrekonstruktion in Frage. Zusätzlich konnten die genetischen Distanzen statistisch ausgewertet den Trend der Unterschiede von Populations- bis zum Gattungsniveau verdeutlichen. Gerade im Fall der beiden *Euchloe*-Arbeiten wird mit der DNA-Analyse eine derart hohe Differenzierungs- und Identifizierungsqualität erreicht, dass die Veröffentlichungen Revisionscharakter erhalten, zumal eine Vielzahl weiterer biologischer Daten in diese integrative Arbeit eingeflossen sind.

Bei der Untersuchung der *Callophrys*-Arten bei ten Hagen & **Miller** 2010 konnte am Ende eine Neuaufstellung der Arten gezeigt werden, die molekulare Identifizierung alleine ist aber in diesem Fall nicht ausreichend, weil sich zu wenige spezifische variable Positionen im COI-Gen fixiert und akkumuliert haben, um es als eindeutiges Bestimmungswerkzeug verwenden zu können.

Die umfangreiche molekulare Analyse der Schwimmkäferartengruppe um *Rhantus suturalis* (Balke, ..., **Miller**, ... 2009) geht über das reine Identifizieren von „taxonomischen Einheiten“ hinaus und ergründet mit über 7.000bp DNA-Sequenzinformation pro Individuum einerseits die Phylogenie der Artengruppe, und zeigt darüber hinaus die Besiedelungs- und Speziationsmechanismen, die die Arten dieser generalistischen Artengruppe von Neuguinea aus ein sehr großes Verbreitungsgebiet erschließen ließen.

Eine eindeutige Korrelation von DNA-Sequenz und Pheromotypen, nicht aber mit der morphologischen Determination brachte die Identifikation von zwei Zwillingarten von Eulenaltern der Gattung *Plusia* (Hille, **Miller** & Erlacher 2005) mittels molekularer Daten. Dieses Beispiel verdeutlichte das unter Umständen eingeschränkte Bestimmungspotential rein morphologischer Merkmale, wenn sie zwischen zwei Arten Übergangsformen aufweisen. Durch die erfolgreiche DNA-taxonomische Zuordnung der Larven zur Prachtlibellenart *Polythore spaeteri* (Etscher, **Miller** & Burmeister 2006) konnten die Erkenntnisse zur Biologie einer Art um einen bedeutenden Anteil vergrößert und somit für eine gesamte Gattung die ersten Abbildungen und morphologischen Untersuchungen an den Larvalstadien exemplarisch dargestellt werden.

Ökologisch intendierte Untersuchungen zeigten die erfolgreiche kombinierte Analyse von zoologischem und botanischem Material aus einer Geometridenlarve (**Miller** et al. 2006). Es konnte sowohl das Taxon (die Geometridenart) molekular bestimmt

werden, als auch aus dem Darminhalt der Raupe die Fraßpflanze eindeutig molekular bestimmt werden.

Neue Erkenntnisse über die Möglichkeit, mittels PCR-Test und DNA-Sequenzanalyse das aufgenommene Futter bei Insekten zu bestimmen, lieferten die Untersuchungen bei Matheson, Müller, Junnila, Vernon, Hausmann, **Miller**, Greenblatt, & Schlein (2008). Hier wurde der Degradierungsprozesses der DNA in Abhängigkeit der Verweildauer des Nahrungsbreis im Insektendarm molekularbiologisch nachgewiesen und quantifiziert. Zusammen mit der vorigen Studie stellt diese eine weitere wissenschaftliche Anwendungsmöglichkeit der Integrierten DNA-Taxonomie dar.

Die Synthese von Molekularbiologie und klassischer Systematik hat, wie oben dargestellt, ein großes Potenzial, den Erkenntnisgewinn in diesem Wissenschaftszweig zu steigern. Es hat sich deutlich gezeigt, dass die eine Disziplin ohne das Wissen der jeweils anderen weniger erfolgreich ist und tiefer gehende Erkenntnisse nicht gewonnen werden können. Die Zusammenführung beider Disziplinen als gleichberechtigte und gleich wichtige Bausteine zur integrierten DNA-Taxonomie ist die konsequente Weiterentwicklung der grundlegenden Arbeiten der letzten Jahrzehnte. Den Anstoß, den Tautz et al. 2003 mit ihrer Forderung nach einer DNA-Taxonomie gaben, führte zu einer Steigerung der Attraktivität der Taxonomie für junge Forscher, die durch die Anwendung moderner molekularer Methoden höhere Wertschätzung ihrer Arbeiten erfuhren. Damit trugen Tautz et al. (2003) dazu bei, das damals bestehende „taxonomic impediment“ (Wheeler et al. 2004) umzukehren und den Status der modernen Taxonomie in der Wissenschaftslandschaft wieder zu festigen.



## 6. Literaturverzeichnis

Aus dieser Dissertation wurden einzelne Teilaspekte bereits publiziert. Im Folgenden sind die entsprechenden Veröffentlichungen nach den vorangegangenen Kapiteln sortiert:

### Kapitel 1: Labor-Methoden

- Knölke, S., Erlacher, S., Hausmann, A., **Miller, M.A.** & Segerer, A.H. (2005): A procedure for combined genitalia dissection and DNA extraction in Lepidoptera. *Insect Systematics & Evolution* 35: 401-409.

### Kapitel 2: Analyseverfahren

- Laamanen, Torsten R., Meier, R., **Miller, M.A.**, Hille, A. & Wiegmann, B.M. (2005): Phylogenetic analysis of *Themira* (Sepsidae: Diptera): Sensitivity Analysis, Alignment, and Indel Treatment in a Multigene Study. *Cladistics* 21 (2005): 258-271.

### Kapitel 3: Art-Neubeschreibungen

- Buchsbaum, U. & **Miller, M.A.** (2002): *Leucoblepsis taiwanensis* sp. nov., a new species of Drepanidae from Taiwan (Insecta: Lepidoptera). *Formosan Entomologist* 22: 101-114.
- Speidel, W., Buchsbaum, U. & **Miller, M.A.** (2005): A new *Paracymoriza* species from Lombok (Indonesia) (Lepidoptera, Crambidae). *Bonner Zoologische Beiträge* 53 (1/2), 227-234.
- Hausmann, A., **Miller, M. A.**, Leipnitz, M. & Bläsius, R. (2007): *Idaea nigra* Hausmann & Bläsius, sp. n. from La Gomera, Canary Islands, Spain (Lepidoptera: Geometridae, Sterrhinae). *SHILAP Revta. lepid.*, 35 (140): 1-7.
- **Miller, M.A.** (2009): *Colias jomooseri* spec. nov. und *Colias wernerbacki* spec. nov., zwei neue Gelblingsarten vom Himalaya - Gebirge, Bhutan (Lepidoptera: Pieridae). *Atalanta* 40 (3/4): 479-486; 529-530.

### Kapitel 4: Artabgrenzungen/Phylogenie

- Back, W., Knebelsberger, T. & **Miller, M.A.** (2006a): Molecular investigation of the species and subspecies of the genus *Anthocharis* BOISDUVAL, RAMBUR, DUMÉRIL & GRASLIN, 1833 with special focus on the *cardamines* – group (Lepidoptera: Pieridae). *Linneana Belgica* 20 (6), 245-253.
- Back, W., Knebelsberger, T. & **Miller, M.A.** (2006b): The phylogenetic relationships of the species and subspecies of the subgenus *Elphinstonia* KLOTS, 1930 (Lepidoptera: Pieridae). *Atalanta* 20 (6), 245-253.
- Back, W., Knebelsberger, T. & **Miller, M.A.** (2008): Molekularbiologische Untersuchungen und Systematik der paläarktischen Arten von *Euchloe* HÜBNER, [1819] (Lepidoptera: Pieridae). *Entomologische Zeitschrift Stuttgart* 118 (4): 147-169.
- Back, W., **Miller, M.A.** & Opler, P.A. (2011): Genetic, phenetic, and distributional relationships of Nearctic *Euchloe* (Pieridae: Lepidoptera). *Journal of the Lepidopterist's Society* 65 (1): 1-14.
- ten Hagen, W. & **Miller, M.A.** (2010): Molekulargenetische Untersuchungen der palaearktischen Arten des Genus *Callophrys* BILLBERG, 1820 mit Hilfe eines mtDNA-COI-Barcodes und taxonomische Überlegungen (Lepidoptera: Lycaenidae). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo N.F.* 30 (4): 177-197.

- Balke, M., Ribera, I. **Miller, M.A.**, Hendrich, L., Sagata, K., Posman, A., Vogler, A. P. & Meier, R. (2009): New Guinea highland origin of a widespread arthropod supertramp. *Proc. R. Soc. B.* 276: 2359-2367.

### **Kapitel 5: Identifikationen**

- Hille, A., **Miller, M.A.**, Erlacher, S. (2005): DNA sequence variation at the mitochondrial cytochrome oxidase I subunit among pheromotypes of the sibling taxa *Diachrysia chrysitis* and *D. tutti* (Lepidoptera: Noctuidae). *Zoologica Scripta* 34: 49-56.
- Etscher, V., **Miller, M.A.** & Burmeister, E.-G. (2006): The larva of *Polythore spaeteri* Burmeister&Börzsöny with comparison to other polythorid larvae and molecular species assignment (Zygoptera: Polythoridae). *Odonatologica* 35 (2): 127-142.
- Knebelsberger, T. & **Miller, M.A.** (2007): Revision and phylogeny of the *subaptera*-group of *Phyllodromica* (Blattoptera: Blattellidae: Ectobiinae), including a parthenogenetic species and the evaluation of COI sequences for species identification (DNA barcoding). *Zootaxa* 1522: 1–68.

### **Kapitel 6: Ökologische Anwendungen**

- **Miller, M.A.**, Müller, G.C., Kravchenko, V.D., Junnila, A., Vernon, K.K., Matheson, C. D. & Hausmann, A. (2006): DNA-based identification of Lepidoptera larvae and plant meals from their gut content. *Russian Entomological Journal* 15 (4), 427-432.
- Matheson, C.D., Müller, G.C., Junnila, A., Vernon, K., Hausmann, A., **Miller, M.A.**, Greenblatt, C. and Schlein, Y. (2008): A PCR method for detection of plant meals from the guts of insects. *Organisms, Diversity & Evolution* 7: 294-303.

**Weitere Literaturstellen:**

- Abdel-Malek, A.A., Baldwin, W.F. (1961): Specificity of plant feeding in mosquitoes as determined by radioactive phosphorus. *Nature* 192, 178–179.
- Akey, D.H., Hayes, J.L. & Fleischer, S.J. (1991): Use of elemental markers in the study of arthropod movement and trophic interactions. *Southwest. Entomol.* 14 (Suppl.), 1–87.
- Allard, M.W., Carpenter, J.M. (1996): On weighting and congruence. *Cladistics*, 12, 183–198.
- Allard, M.W., Farris, J.S. & Carpenter, J.M. (1999): Congruence among mammalian mitochondrial genes. *Cladistics*, 15, 75–84.
- Aris-Brosou, S. (2003): Least and most powerful phylogenetic tests to elucidate the origin of the seed plants in the presence of conflicting signals under misspecified models. *Syst. Biol.* 52, 781–793.
- Arnedo, M.A., Coddington, J., Agnarsson, I. & Gillespie, R.G. (2004): From a comb to a tree: phylogenetic relationships of the combfooted spiders (Araneae, Theridiidae) inferred from nuclear and mitochondrial genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 225–245.
- Artiss, T., Schultz, T.R., Polhemus, D.A. & Simon, C. (2001): Molecular phylogenetic analysis of the dragonfly genera *Libellula*, *Ladona*, and *Plathemis* (Odonata: Libellulidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase I and 16S rRNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 348-361.
- Augusti, N., Aramburu, J. & Gabarra, R. (1999a): Immunological detection of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) ingested by heteropteran predators: time-related decay and effect of meal size on detection period. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92, 56–62.
- Augusti, N., de Vincente, M.C. & Gabarra, R. (1999b): Development of sequence amplified characterization region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. *Mol. Ecol.* 8, 1467–1474.
- Augusti, N., de Vincente, M.C. & Gabarra, R. (2000): Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporariorum*. *Insect Mol. Biol.* 9, 263–268.
- Augusti, N., Unruh, T.R. & Welter, S.C. (2003): Detecting *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera: Psyllidae) in predator guts using COI mitochondrial markers. *Bull. Entomol. Res.* 93, 179–185.
- Austin, A. D. et al. (2004): Insects ‘Down Under’ diversity, endemism and evolution of the Australian insect fauna: examples from select orders. *Aust. J. Entomol.* 43, 216–234.
- Bacallado, J. J., Hausmann, A., Moro, L. & Vera, A. (2006): La subfamilia Sterrhinae Meyrick, 1892 (Lepidoptera: Geometridae) en las Islas Canarias.– *Rev. Acad. Canar. Cienc.*, 17(4): 73-102.
- Back, W. (1977): Zur Artverschiedenheit von *Anthocharis belia belia* (Linné, 1767) und *A. euphenoides euphenoides* (Staudinger, 1869). *Lep. Pieridae. Atalanta* 8: 30-39.
- Back, W. (1979): Zur Biologie der europäischen und nordwestafrikanischen Populationen von *Euchloe ausonia* Hübner 1804. (*Lep. Pieridae*). *Atalanta* 10, 225-243.
- Back, W. (1981): Über die Biologie von *Euchloe charlonia amseli* Gross und Ebert 1975. *Atalanta* 11, 48-60.
- Back, W. (1984a): Beschreibung der Präimaginalstadien von *Euchloe tagis pechi* Staudinger 1885. (*Lep., Pieridae*). *Atalanta* 15, 152-164.
- Back, W. (1984b): Die Präimaginalstadien von *Euchloe falloui* Allard, 1867. (*Lep., Pieridae*). *Atalanta* 15, 165-166.

- Back, W. (1991a): Taxonomische Untersuchungen innerhalb der Artengruppe um *Euchloe ausonia* (Hübner, 1804). (Lepidoptera, Pieridae). Atalanta (Dezember 1990) 21 (3/4), 187-206, Farbtafeln II, III.
- Back, W. (1991b): Die Präimaginalstadien von *Euchloe charlonia* (Donzel, 1842) im Vergleich zu *Euchloe penia* (FREYER, 1852) und *Euchloe transcaspica* ssp. *amseli* (Gross & Ebert, 1975). (Lep., Pieridae). Atalanta 22 (2/4), 357-363, Farbtafeln XXIV - XXVI.
- Back, W. (2001a): Zur Biologie von *Euchloe belemia hesperidum* Rothschild, 1913. (Lepidoptera, Pieridae). Atalanta 32 (1/2), 103-106, Farbtafeln V, VIa.
- Back, W. (2001b): Beschreibung einer neuen Unterart von *Euchloe tagis* Hübner, 1804: *Euchloe tagis piemonti* subsp. nov. (Lepidoptera, Pieridae). Atalanta 32 (1/2), 99-102, Farbtafeln III, IV.
- Back, W., & Leestmans R. (2001): Une nouvelle sous-espèce d'*Euchloe penia* (Freyer, 1852) du Nord-Ouest de l'Iran: *taleschicus* ssp. nova (Lepidoptera: Pieridae). Linneana Belgica, Pars XVIII, n° 4, 193-198.
- Back, W. (2005): Eine neue Unterart von *Anthocharis cardamines* (Linnaeus, 1758) von Nord-Iran: *carolinae* subsp. nov. (Lepidoptera, Pieridae). Atalanta 36(3/4), 475-480.
- Back, W. (2006): New taxonomic status for *Anthocharis cardamines carolinae* Back, 2005 (Lepidoptera: Pieridae), Linneana Belgica 20 (6), 000-000.
- Back, W., Knebelsberger, T. & Miller, M. A. (2006 a): Molecular investigation of the species and subspecies of the genus *Anthocharis* Boisduval, Rambur, Dumeril & Graslín, 1833 with special focus on the *cardamines*-group (Lepidoptera: Pieridae). Linneana Belgica 20 (6): 245-253.
- Back, W., Knebelsberger, T. & Miller, M.A. (2006 b): The phylogenetic relationships of the species and subspecies of the subgenus *Elphinstonia* Klots, 1930 (Lepidoptera: Pieridae). Atalanta, Marktleuthen 37 (3/4): 469-482.
- Back, W., Knebelsberger, T. & Miller, M.A. (2008): Molekularbiologische Untersuchungen und Systematik der palaearktischen Arten von *Euchloe* Hübner, [1819] (Lepidoptera: Pieridae). Entomologische Zeitschrift, Stuttgart 118 (4): 151-169.
- Back, W., Olivares, J. & Leestmans, R. (2005): Une nouvelle sous-espèce d'*Euchloe bazae* (Fabiano, 1993) d'Aragón, dans le N.-E. de l'Espagne: *iberiae* ssp. nova (Lepidoptera: Pieridae). Linneana Belgica, Pars XX, n° 2, juin 2005. Erratum (Linneana Belgica, Pars XX, n° 2, juin 2005, p. 68). Supplement Linneana Belgica, Pars XX, n° 3, septembre 2005.
- Back, W. & Reissinger, E. (1989): *Euchloe tagis reisseri* subsp. n., eine gut charakterisierte Unterart aus dem Rif-Gebirge (Lepidoptera, Pieridae). Nota lepid. 12 (2), 86-102.
- Baez, M. (1998): Mariposas de Canarias: 216 pp., Editorial Rueda, Alcorcón.
- Baker, G. T. (1889): On the distribution of the *charlonia* group of the genus *Anthocharis*. Trans. Ent. Soc. Lond. (IV): 523-533.
- Baker, R. H. & DeSalle, R. (1997): Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. Syst. Biol. 46, 654-673.
- Baker, R.H., Wilkinson, G.S. & DeSalle, R. (2001): Phylogenetic utility of different types of molecular data used to infer evolutionary relationships among stalk-eyed flies (Diptera: Diopsidae). Syst. Biol. 50, 87-105.
- Balke, M. (2001): Biogeography and classification of New Guinea Colymbetini (Coleoptera: Dytiscidae). Invertebrate Taxonomy 15, 259-275.

- Balke, M., Pons, J., Ribera, I., Sagata, K. & Vogler, A. P. (2007a): Infrequent and unidirectional colonization of hyperdiverse *Papuadytes* diving beetles in New Caledonia and New Guinea. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42, 505–516.
- Balke, M., Ribera, I. & Vogler, A. P. (2004): MtDNA phylogeny and biogeography of Copelatinae, a highly diverse group of tropical diving beetles (Dytiscidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 866–880.
- Balke, M., Wewalka, G., Alarie, Y. & Ribera, L. (2007b): Molecular phylogeny of Pacific island Colymbetinae: radiation of New Caledonian and Fijian species (Coleoptera, Dytiscidae). *Zool. Scr.* 36, 173–200.
- Bandelt, H.-J., Forster, P. & Röhl, A. (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, Oxford: 16, 37–48.
- Barker, F. K., Cibois, A., Schikler, P., Feinstein, J. & Cracraft, J. (2004): Phylogeny and diversification of the largest avian radiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 11 040–11 045.
- Barker, F.K. & Lutzoni, F.M. (2002): The utility of the incongruence length difference test. *Syst. Biol.* 51, 625–637.
- Basset, Y. (1992): Host specificity of arboreal and free living insect herbivores in rain forests. *Biol. J. Linn. Soc.* 47, 115–133.
- Bechly, G. (1998): Phylogenetic Systematics of Odonata. <http://www.bechly.de/system.htm>
- Bellemain, E. & Ricklefs, R. (2008): Are islands the end of the colonisation road? *Trends Ecol. Evol.* 23, 461–468.
- Belsky, A.J. (1986): Does herbivory benefit plants? A review of the evidence. *Am. Nat.* 127, 870–892.
- Benyamini, D. (1990): A field guide to the butterflies of Israel. - Jerusalem (Keter Publishing House); 234 S.
- Benyamini, D. (1993): The butterflies of Mt Hermon. (Lepidoptera: Rhopalocera and Hesperioidea) – *Linneana Belgica*, Beersel, 14(4): 167-204.
- Benyamini, D. (2002a): The Butterflies of Dana Reserve, Edom, Jordan (Lepidoptera: Papilionoidea et Hesperioidea) (2nd part). *Linneana Belgica*, Pars XVIII, n° 6: 265-272.
- Benyamini, D. (2002b): The Butterflies of Dana Reserve, Edom, Jordan (Lepidoptera: Papilionoidea et Hesperioidea) (3rd part). *Linneana Belgica*, Pars XVIII, n° 7: 351-360.
- Bernardi, G. (1945): Etudes sur le genre *Euchloë* Hb. (Lep., Pieridae). *Mis. Ent.* 42: 65-104.
- Bernardi, G. (1947): La nomenclature de quelques formes européennes de *l'Euchloë Ausonia* Hb. (= *Belia* Auct.) (Lep., Pieridae). *Miscellanea entom.* 44: 1-7.
- Bernardi, G. (1957): Contribution à l'étude des pseudodual species: une nouvelle espèce iranienne d'*Euchloë* Hb [Lep. Pieridae]. *Bull. Soc. Ent. France* 62 (I.-II. 1957), 38-41.
- Bick, G. H. & Bick, J. C. (1986): The genus *Polythore* exclusive of the *picta* group (Zygoptera: Polythoridae). *Odonatologica* 15 (3): 245-273
- Bjorklund, M. (1999): Are third positions really that bad? A test using vertebrate cytochrome b. *Cladistics* 15, 191–197.
- Blaxter, M. (2003) Counting angels with DNA. *Nature* 421: 122.
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R. & Eyualem-Abebe (2005): Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Phil. Trans. R. Soc. B*: doi:10.1098/rstb.2005.1725.

- Boer, A. J. & Duffels, J. P. (1996): Historical biogeography of the cicadas of Wallacea, New Guinea and the West Pacific: a geotectonic exploration. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 124, 153–177.
- Boge, A., Gerstmeier, R. & Einspanier, R. (1994): Molecular polymorphism as a tool for differentiating ground beetles (*Carabus* species): application of ubiquitin PCR/SSCP analysis. *Insect Molecular Biology* 3 (4): 267-271.
- Bohn, H. (1999): Revision of the *carpetana*-group of *Phyllodromica* Fieber from Spain, Portugal and France. *Spixiana, Suppl.* 25, 1–102.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M. & van der Noordaa, J. (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.
- Braby, M.F. & Pierce, N.E. (2007) Systematics, biogeography and diversification of the Indo-Australian genus *Delias* Hübner (Lepidoptera: Pieridae): phylogenetic evidence supports an 'out-of-Australia' origin. *Syst. Entomol.* 32, 2–25.
- Braby, M.F., Vila, R. & N.E. Pierce (2006): Molecular phylogeny and systematics of the Pieridae (Lepidoptera: Papilionoidea): higher classification and biogeography. - *Zool. J. Linn. Soc.* 147: 239-275, London.
- Brammer, F.P. (2002): Species concepts and conservation priorities: a study of birds in north-east Brazil. Master's thesis, University of Copenhagen, Denmark
- Bremer, K. (1994). Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10, 295–304.
- Broughton, R.E., Stanley, S.E. & Durrett, R.T. (2000): Quantification of homoplasy for nucleotide transitions and transversions and a reexamination of assumptions in weighted phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 49, 617–627.
- Brower, A.V.Z. (1994): Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliiconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. – *Proceedings of National Academy of Science, Washington, USA* 91: 6491-6495.
- Brower, A.V.Z. (2006): Problems with DNA barcodes for species delimitation: Ten species of *Astraptes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: Hesperidae). – *Systematics and Biodiversity*, London, 4: 127-132.
- Brown, J.W., Real, H.G. & Faulkner D.K. (1992): Butterflies of Baja California. Faunal survey. Natural history. Conservation biology. The Lepidoptera Research Foundation, Inc., Beverly Hills, Calif., v+129 pp., 8 pls, 9 figs, maps.
- Brown, P.A. (1997): A review of techniques used in the preparation, curation and conservation of microscope slides at the Natural History Museum, London. *The Biology Curator* 10: 1-33.
- Buchsbaum, U. & Miller, M.A. (2002): *Leucoblepsis taiwanensis* sp. nov., a new species of Drepanidae from Taiwan (Insecta: Lepidoptera). *Formosan Entomologist* 22: 101-114, Taipei.
- Buchsbaum, U. (2000): *Agnidra alextoba* sp. n. aus Sumatra (Lepidoptera, Drepanidae). - *Mitt. Münch. Ent. Ges.* 90: 85 - 89.
- Buresch, I. & Peschev, G. (1957): Artenbestand und Verbreitung der Geradflügler (Orthoptera) in Bulgarien. II. Blattodea, Mantodea, Gryllodea. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academy of Science of Bulgaria*, 6, 305–356.
- Burmeister, E.G. & Börzsöny, L., (2003): *Polythore spaeteri*, spec. nov. from the Peruvian tropical rainforest (Panguana), with remarks on its ecology (Odonata, Zygoptera, Polythoridae). *Spixiana* 26(1): 43-48

- Burnside, C.A., Smith, P.T. & Kambhampati, S. (2000): Three new species of the wood roach, *Cryptocercus* (Blattodea: Cryptocercidae) from the eastern United States. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 72, 361–378.
- Burr, M., Campbell, B.P. & Uvarov, B.P. (1923): A contribution to our knowledge of the Orthoptera of Macedonia. *Transactions of the Entomological Society of London*, 1923, 110–169.
- Butler, A.G. (1886): On Lepidoptera collected by Major Yerbury in Western India. *Proc. zool. Soc. Lond.* 376, pl. XXXV, fig. 4.
- Calvert, P.P. (1911): Studies on Costa Rican Odonata; I. – The Larva of *Cora*. *Entomological News* 21: 334-337
- Casini, P.M. (1993): Première station pour l'Italie péninsulaire d'*Euchloe tagis* Hübner (1804) et description de la ssp. nov. *calvensis* (Lepidoptera: Pieridae). *Linneana Belgica*, Pars 14, n° 1: 3-14.
- Caterino, M.S., Cho, S. & Sperling, F.A.H. (2000): The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 45: 1-54.
- Caterino, M.S., Reed, R.D., Kuo, M.M. & Sperling, F.A.H. (2001): A partitioned likelihood analysis of swallowtail butterfly phylogeny (Lepidoptera: Papilionidae). *Systematic Biology* 50: 106-127.
- Cates, R.G. (1980): Feeding patterns of monophagous, oligophagous, and polyphagous insect herbivores, the effect of resource abundance and plant chemistry. *Oecologia* 46, 22–31.
- Chen, Y., Giles, K.L., Payton, M.E. & Greenstone, M.H. (2000): Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. *Mol. Ecol.* 9, 1887–1898.
- Chew F.S. & Watt, W.B. (2006): The green-veined white (*Pieris napi* L.), its Pierine relatives, and the systematics dilemmas of divergent character sets (Lepidoptera, Pieridae). *Biol. J. Linn. Soc.* 88: 413-435, London.
- Cho, S., Mitchell, A., Regier, J. C., Mitter, C., Poole, R. W., Friedlander, T. P. & Zhao, S. (1995): A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: elongation factor 1-alpha recovers morphology-based tree for heliothine moths. *Mol. Biol. Evol.* 12, 650–656.
- Chow-Shaffer, E., Sina, B., Hawley, W.A., De Benedictis, J. & Scott, T.W. (2000): Laboratory and field evaluation of polymerase chain reaction-based forensic DNA profiling for use in identification of human blood meal sources of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 37, 492–502.
- Chu, H.Y. & Wang L.Y. (1991): Lepidoptera: Cyclidiidae, Drepanidae. In: *Fauna Sinica. Insecta*, Vol. 3: 1 - 269, 10 pls., Beijing: Sci. Press (In Chinese with english summary)
- Clark, J.R., Ree, R.H., Alfaro, M.E., King, M.G., Wagner, W.L. & Roalson, E.H. (2008) A comparative study in ancestral range reconstruction methods: retracing the uncertain histories of insular lineages. *Syst. Biol.* 57, 693–707.
- Clarke, J.F.G. (1941): The preparation of slides of the genitalia of Lepidoptera. *Bulletin of the Brooklyn Entomological Society* 36: 149-161.
- Cohen, S. & Roth, L.M. (1970): Chromosome Numbers of the Blattaria. *Annals of the Entomological Society of America*, Volume 63, Number 6, 1520–1547.
- Corley, L.S., Blankenship, J.R., Moore, A.J. & Moore, P.J. (1999): Developmental constraints on the mode of reproduction in the facultatively parthenogenetic cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Evolution & Development*, 1 (2), 90–99.
- Cracraft, J. (1983): Species concepts and speciation analysis. *Curr. Ornithol.* 1, 159–187.

- Cronk, Q.C.B., Kiehn, M., Wagner, W. L. & Smith, J.F. (2005): Evolution of *Cyrtandra* (Gesneriaceae) in the Pacific Ocean: the origin of a supertramp clade. *Am. J. Bot.* 92, 1017–1024. (doi:10.3732/ajb.92.6.1017)
- Cruickshank, R. (2002): <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/%7Ercruicks/rcruickshank.html>
- Cunningham, C.W. (1997a): Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Mol. Biol. Evol.* 14, 733–740.
- Cunningham, C.W. (1997b): Is congruence between data partitions a reliable predictor of phylogenetic accuracy? Empirically testing an iterative procedure for choosing among phylogenetic methods. *Syst. Biol.* 46, 464–478.
- D`Abrera, B. (1993): Butterflies of the Holarctic Region. Part III Nymphalidae (concl.), Libytheidae, Riodinidae & Lycaenidae. Victoria, Australia (Hill House): 524 S.
- Dang, P.T. (1993): Vesicas of selected Tortricid and small lepidopterous species. With descriptions of new techniques of vesica eversion (Lepidoptera: Tortricidae, Oecophoridae, Gelechiidae and Nepticulidae). *The Canadian Entomologist* 125: 785-799.
- Darlu, P. & Lecointre, G. (2002): When does the incongruence length difference test fail? *Mol. Biol. Evol.* 19, 432–437.
- De Marmels, J. (1982): La nayade de *Cora cyane* Selys, 1853 (Odonata: Polythoridae). *Boletín de Entomología Venezolana*. N.S. 2(13): 107-110
- De Marmels, J. (1988): Generic characters of *Chalcothore* DeMarmels, 1985, with notes on the male of *C. montgomeryi* (Racenis 1968) and a description of the Larva (Zygoptera: Polythoridae). *Odonatologica* 17(4): 379-384
- De Marmels, J. (1992): Caballitos del *Diablo* (Odonata) de las Sierras de Inpirapeco y Unturan, en el extremo sur de Venezuela. *Acta Biologica Venezuelica* 14(1): 57-78
- De Marmels, J. (1995): La larva de *Euthore fastigiata meridana* Selys, 1879 (Odonata: Polythoridae). *Boletín de Entomología Venezolana*. N.S. 10(2): 131-134
- DeSalle R., Egan M.G. & Siddall M. (2005): The unholy trinity: Taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 360 (1462): 1905–1916.
- DeVerno, L.L., Smith, C.A. & Harrison, K.J. (1998): Randomly amplified polymorphic DNA evidence of introgression in two closely related sympatric species of coniferophagous *Choristoneura* (Lepidoptera: Tortricidae) in Atlantic Canada. *Annals of the Entomological Society of America* 91: 248-259.
- Diamond, J.M. (1974): Colonisation of exploded volcanic islands by birds: the supertramp strategy. *Science* 184, 803–806. (doi:10.1126/science.184.4138.803)
- Dietz, M. (2002): *Colias* Fabricius, 1807. Arten und Unterarten aus der Palaearctischen Region. Teil 1. Eigenverlag, Solms.
- Dolphin, K., Belshaw, R., Orme, C.D.L., & Quicke, D.L.J. (2000): Noise and incongruence: Interpreting results of the incongruence length difference test. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17, 401–406.
- Dos Passos, C.F. & Klots, A.B. (1969): The systematics of *Anthocharis midea* Hübner (Lepidoptera: Pieridae), *Entomologica Americana* Vol. 45, 1-34.
- Dos Santos, N.D. & Costa, J.M. (1987): Descriçao da ninfa de *Chalcopteryx rutilans* (Rambur 1842) Selys, 1853 (Odonata: Polythoridae). *Actas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro* 27: 1-4
- Dowton, M., & Austin, A.D. (2002): Increased congruence does not necessarily indicate increased phylogenetic accuracy: The behavior of the incongruence length difference test in mixed-model analyses. *Syst. Biol.* 51, 19–31.



- Dransfield, J. (1981): Palms and Wallace line. In Wallace's line and plate tectonics (ed. T. C. Whitmore), pp. 43–56. Oxford, UK: Clarendon.
- Drenski, P. (1939): Beitrag zur Kenntnis der Schaben (Blattoidea) in Bulgarien. Mitteilungen der Bulgarischen Entomologischen Gesellschaft in Sofia, 8, 1–10.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- Dubatolov, V.V. & Kosterin, O.E. (1994): A new subspecies of the *Euchloe ausonia* Hübner species group from the highlands of the Dzhungarian Alatau (East Kazakhstan). *Atalanta* 25 (3/4): 513.
- Eastop, V. (1979): *Sternorrhyncha* as angiosperm taxonomists. *Symb. Bot. Uppsala* 22, 120–134.
- Eberhard, W.G. (2001): Multiple origins of a major novelty: moveable abdominal lobes in male sepsid flies (Diptera: Sepsidae), and the question of developmental constraints. *Evol. Dev.* 3, 206–222.
- Ebert, G. (Hrsg.)(1991): Die Schmetterlinge Baden-Württembergs, Band 2: Tagfalter II. – Stuttgart (Ulmer): 535 S.
- Eckweiler, W. & Hofmann, P. (1980): Verzeichnis iranischer Tagfalter – Checklist of Iranian butterflies. – Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo, Frankfurt am Main, Supplementum 1: 1-28.
- Eckweiler, W. (1981): Beiträge zur Kenntnis der Rhopaloceren Irans. 16. Beitrag: Lepidopteren aus Kerman. — Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo, Frankfurt am Main, N.F. 2 (1): 43–54.
- Edgar, R.C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Edgecombe, G.D. & Giribet, G. (2003): A new blind *Lamyctes* (Chilopoda: Lithobiomorpha) from Tasmania with an analysis of molecular sequence data for the *Lamyctes-Henicops* Group. *Zootaxa*, 152, 1–23.
- Ehrlich, P.R. & Raven, P.H. (1964): Butterflies and plants, a study in coevolution. *Evolution* 18, 586–608.
- Eliasson, C.U., Ryrholm, N., Holmer, M., Jilg, K. & Gärdenfors, U. (2005): Nationalnyckeln till Sveriges flora och fauna. Fjärilar: Dagfjärilar. Hesperidae – Nymphalidae. – Uppsala (ArtDatenbanken, SLU), 407 S.
- Emmel, T.C. & Emmel J.F. (1973): The butterflies of Southern California. Natural History Museum of Los Angeles County. Science Series 26: xi + 128 pp., 10 pls., 97 figs.
- Emmel, T.C. (ed.) (1998): Systematics of western North American butterflies. Mariposa Press. Gainesville, Florida, xviii + 878 pp, tables.
- Eriksson, T. (2001): AutoDecay ver. 5.0. (program distributed by the author). Bergius Foundation, Royal Swedish Academy of Science, Stockholm.
- Farris, J.S. (2001): Support weighting. *Cladistics*, 17, 389–394.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Fernandez – Rubio, F. (1991): Guia de Mariposas Diurnas de la Peninsula Iberica, Baleares, Canarias, Azores y Madeira. – Madrid (Ediciones Pyramide); 406 S.
- Fernandez Rubio, F. (1985): *Euchloe belemia* ssp. *eversi* Stamm, 1963 ♂ Una "Especie en estado naciente"? (Lep. Pieridae). *Bol. Gr. Ent. Madrid*, Vol. 1: 117-123.

- Fernandez-Rubio, F. (1986): Ein Beitrag zur Technik der Maceration, Präparation und Färbung der Genitalarmaturen von Schmetterlingen. *Entomologische Zeitschrift* 96: 241-245.
- Ferris, C.D. & Brown, F.M. (1981): *Butterflies of the Rocky Mountain States*. University of Oklahoma Press, Norman, xix + 442 pp.
- Fiedler, K. (1990): Bemerkungen zur Larvalbiologie von *Callophrys rubi* L. (Lepidoptera: Lycaenidae) – Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo, Frankfurt am Main, N.F. 11 (3): 121-141.
- Filardi, C.E. & Moyle, R.G. (2005): Single origin of a pan-Pacific bird group and upstream colonisation of Australasia. *Nature* 438, 216–219.
- Fluxus Technology Ltd.: NETWORK V. 4.1.1.2 software package available at [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)
- Forster, P., Torroni, A., Renfrew, C. & Röhl, A. (2001): Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Mol Biol Evol* 18: 1864-1881.
- Fraser, F.C. (1957): *A Reclassification of the Order Odonata*. Royal Zoological Society of New South Wales, Sydney.
- Friedrich, M. & Tautz, D. (1995): rDNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. *Nature* 376: 165-167.
- Funk, D.J. & Omland, K.E. (2003): Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes and consequences with insights from animal mitochondrial DNA. – *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, Palo Alto, USA 34: 397-423.
- Garb, J.E. & Gillespie, R.G. (2006): Island hopping across the central Pacific mitochondrial DNA detects sequential colonisation of the Austral Islands by crab spiders (Araneae: Thomisidae). *J. Biogeogr.* 33, 201–220.
- Garth, J. S. & Tildon, J. W. (1986): *California Butterflies*. – Berkeley (University of California Press Ltd.): 246 S., 24 Farbtafeln.
- Gatesy, J., DeSalle, R. & Wheeler, W. (1993): Alignment-ambiguous nucleotide sites and the exclusion of systematic data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2, 152–157.
- Gerstmeier, R. & Sedlmair, D. (2004): Molekularbiologie, Faunistik und Zoogeographie. *Acta Entomologica Slovenica* 12 (1): 15-26.
- Gerstmeier, R., vom Hofe, H., Sedlmair, D. & Einspanier, R. (1998): Populationsökologische und –genetische Untersuchungen an Laufkäfern. *Laufener Seminarbeiträge* 2: 31-37.
- Gillespie, R., Claridge, E.M. & Goodacre, S.L. (2008): Biogeography of French Polynesia: diversification within and between a series of hotspot archipelagoes. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 3347–3361.
- Giribet, G. (2003): Stability in phylogenetic formulations and its relationship to nodal support. *Syst. Biol.* 52, 554–564.
- Giribet, G. & Wheeler, W.C. (1999): On gaps. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13, 132–143.
- Gokool, S., Curtis, C.F. & Smith, D.F. (1993): Analysis of mosquito bloodmeals by DNA profiling. *Med. Vet. Entomol.* 7, 208–215.
- Gomez de Aizpurua, C. (1988): Entomologia descriptiva, Biología y Morfología de las Orugas, Lepidoptera, Tomo V-Danaidae, Papilionidae, Pieridae, Libytheidae, Nymphalidae-. *Boletín de Sanidad Vegetal, Fuera de Serie* n° 11: 83-86: *Euchloe* Hübner [1823] *ausonia* (Hübner, 1804) subsp. *simplonia* (Freyer).
- Gomez-Bustillo, M.R. & Fernandez-Rubio, E. (1974): *Mariposas de la Península Ibérica*, Ropal. I: 192-193; II: 225-227.

- Gorbunov, P. & Kosterin, O. (2003): The butterflies (Hesperioidea and Papilionoidea) of North Asia (Asian part of Russia) in nature. — Moscow (Rodina & Fodio), Chelyabinsk (Gallery Fund); 392 S.
- Gorbunov, P. (2001): The butterflies of Russia: classification, genitalia, keys for identification (Lepidoptera: Hesperioidea and Papilionoidea). Thesis Ekaterinburg; 320 S.
- Goto, S.G. & Kimura, M.T. (2001): Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear Gpdh genes in *Drosophila*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 404-422.
- Gressitt, J.L. (1956) Some distribution patterns of Pacific Island faunas. *Syst. Zool.* 5, 11–33.
- Grieshuber, J. & Churkin, S. (2003): The lectotypes of *Colias diva* Grum-Grshimailo, 1891, *Colias wanda* Grum-Grshimailo, 1907, *Colias grumi* Alpheraky, 1897, *Colias cocandica maja* Grum-Grshimailo, 1891, *Colias cocandica tatarica* Bang-Haas 1915, and *Colias tamerlana mongola* Alpheraky, 1897 (Lepidoptera: Pieridae). *Helios* IV: 244-271, Moscow.
- Guidon S. & Gascuel O. (2003): A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5): 696-704.
- Guillou, H., Maury, R.C., Blais, S., Cotten, J., Legendre, C., Guille, G. & Caroff, M. (2005): Age progression along the society hotspot chain (French Polynesia) based on new unspiked K–Ar ages. *Bull. Soc. Ge´ol. Fr.* 176, 135–150.
- Guppy, C.S. & Sheppard J.H. (2001): Butterflies of British Columbia. University of British Columbia Press, Vancouver, 414 pp.
- Habel, J.C., Meyer, M., El Mousadik, A. & Schmitt, T. (2007): Africa goes Europe: The complete phylogeography of the marbled white butterfly species complex *Melanargia galathea/ M. lachesis* (Lepidoptera: Satyridae). – *Organisms, Diversity & Evolution, Gesellschaft für Biologische Systematik, Elsevier GmH, München*, 8: 121-129.
- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W. & Hebert, P.D.N. (2006): From the cover: DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:968-971.
- Hajibabaei, M., Smith, M.A., Jantzen, D.H., Rodriguez, J.J., Whitefield, J.D. & Hebert, P.D.N. (2006): A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. – *Molecular Ecological Notes* 6 (4): 959-964.
- Hall, R. & Holloway, J.D. (eds) (1998): The plate tectonics of Cenozoic SE Asia and the distribution of land and sea. In: *Biogeography and geological evolution of SE Asia*, pp. 99–124 Leiden, The Netherlands: Backhuys.
- Hall, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Halperin J. & Sauter W. (1992): An annotated list with new records of Lepidoptera associated with forest and ornamental trees and shrubs in Israel. *Israel J. Entom.* Vols. 25/26. P.105–147.
- Hammer, O., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001): PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1): 9 pp.
- Hampson, G.F. (1893): The fauna of British India, including Ceylon and Burma. Moths I: 527 pp. London.
- Harbaugh, D.T. & Baldwin, B.G. (2007): Phylogeny and biogeography of the sandalwoods (*Santalum*, Santalaceae): repeated dispersals throughout the Pacific. *Am. J. Bot.* 94, 1030–1042. (doi:10.3732/ajb.94.6.1028)
- Hausmann, A. (1991): Beitrag zur Geometridenfauna Palästinas: Die Spanner der Klapperich-Ausbeute aus Jordanien (Lepidoptera, Geometridae). *Mitt. Münch. Ent. Ges.* Bd.81. S.111–163.

- Hausmann, A. (2004): Sterrhinae. In A. Hausmann (ed.).– The Geometrid Moths of Europe, 2: 600 pp., 24 pl. Apollo Books, Stenstrup.
- Hebert, P.D.N., Cywinsky, A., Ball, S.L. & deWaard, J.R. (2003a): Biological identifications through DNA barcodes. - Proceedings of the Royal Society London Series B 270 (1511): 313-321.
- Hebert, P.D.N. & Gregory, T.R. (2005): The promise of DNA barcoding for taxonomy. Systematic Biology 54: 852-859.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J., Janzen, D.J. & Hallwachs, W. (2004): Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly, *Astrartes fuligator*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 101: 14812-14827.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & deWaard, J.R. (2003b): Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London, Series B, (Suppl.) 270, 96–99.
- Hedin, M.C. & Maddison, W.P. (2001): A combined molecular approach to phylogeny of the jumping spider subfamily Dendryphantinae (Araneae: Salticidae). Mol. Phylogenet. Evol. 18, 386–403.
- Hendrix, S.H. (1980): An evolutionary and ecological perspective of the insect fauna of ferns. Am. Nat. 115, 171–196.
- Hennig, W. (1966): Phylogenetic Systematics. 1-280. Univ. Illinois Press, Urbana.
- Henriksen, H.J. & Kreutzer, I. (1982): The Butterflies of Scandinavia in Nature. – Odense (Scandinavisk Bokforlag): 215 S.
- Heppner, J.B. & Inoue, H. (1992): Lepidoptera of Taiwan. Vol. 1, Part 2: Checklist. - Assoc. Trop. Lep., Gainesville
- Heppner, J.B. (1991): Faunal Regions and the Diversity of Lepidoptera. - Tropical Lepidoptera 2 (Suppl. 1): 1 - 85.
- Hesselbarth, G., van Oorschot, H. & Wagener, S. (1995): Die Tagfalter der Türkei unter Berücksichtigung der angrenzenden Länder. - Bocholt (Selbstverlag Sigbert Wagener), 3 Bände: 1357+847 Seiten, 470 Farbtafeln, 13 SW-Tafeln, 342 Verbreitungskarten.
- Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B. & Young, J.P.W. (1991): Molecular techniques in taxonomy. NATO ASI Series, Vol. H 57, Springer, Berlin.
- Hicherson, M.J., Meyer, C.P. & Moritz, C. (2006): DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. – Systematic Biology, Oxford 55(5): 729-739.
- Higgins, L.G. & Riley, N.D. (1970): A Field Guide to the Butterflies of Britain and Europe. London (Collins), 381 S.
- Higgins, L.G. & Riley, N.D. (1971): Die Tagfalter Europas und Nordwestafrikas, 2. ed. übersetzt und bearbeitet von Forster, W.: 41-45, 302, pl. 1, 308, pl. 7, 309, pl. 8. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. (1996): Molecular Systematics. 2<sup>nd</sup> edition, Snauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Holloway, J.D. (1998): The moths of Borneo: Families Castanidae, Callidulidae, Drepanidae, Uraniidae. - Malayan Nature J., 52: 1 - 155.
- Holloway, J.D., Kibby, G. & Peggie, D. (2001): The families of Malesian moths and butterflies. Fauna Malesiana Handbook 3. – Brill, Leiden, Boston, Köln: 455 pp.
- Holloway, M. (2006): Democratizing Taxonomy. Conservation in Practice 7 (2): 14-21.

- Hoogendoorn, M. & Heimpel, G.E. (2001): PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Mol. Ecol.* 10, 2059–2067.
- Howe, W.H. (1975): *The butterflies of North America*. Doubleday & Company, Garden City, New York, xiii +663 pp., 97 pls.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Huemer, P. (1987): Eine modifizierte Präparationstechnik für die Gattung *Caryocolum* (Lepidoptera: Gelechiidae). - *Mitteilungen der schweizerischen entomologischen Gesellschaft* 60: 207-211.
- Hurst, G.D.D. & Jiggins, F.M. (2005): Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. – *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 272: 1525-1534.
- Inoue, H. (1988): Taxonomic notes on the Drepanidae from Taiwan, with descriptions of two new species and six new subspecies. - *Tinea, Tokyo*. 12 (15): 125 - 134.
- Janzen D.H. (2004): Now is the time. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B*. Vol.359. P.731–732.
- Jiggins, F.M. (2003): Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: Selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. – *Genetics*, Bethesda 164: 5-12.
- Johnson, K. (1992): The Palaearctic „Elfin“ Butterflies (Lycaenidae, Theclinae). – *Neue Entomologische Nachrichten, Marktleuthen* 29: 1-141.
- Johnson, K. (1976): Concerning the name *Anthocaris coloradensis* Hy. Edwards with designation of a new subspecies. *Journal of the Lepidopterists Society* 30(4): 252-259.
- Johnson, L.A. & Soltis, D.E. (1998): Assessing congruence: examples from empirical data. In: Soltis, P.S., Soltis, D.E., Doyle, J.J. (Eds.), *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. Chapman & Hall, New York, pp. 297–343.
- Johnson, S.A. & Nicolson, S.W. (2001): Pollen digestion by flower-feeding Scarabaeidae: protea beetles (Cetoniini) and monkey beetles (Hopliini). *J. Insect Physiol.* 47, 725–733.
- Jönsson, K.A. & Fjeldsa°, J. (2006): A phylogenetic supertree of oscine passerine birds (Aves: Passeri). *Zool. Scr.* 35, 149–186.
- Juen, A. & Traugott, M. (2005): Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: a case study using a soil insect predator-prey system. *Oecologia* 142, 344–352.
- Junker, M., Kuczkowski, S., Schönitzer, K., Young, C. & Hausmann, A. (2006): Enzymatic digestion – a new method for egg extraction from dry female collection specimens (Lepidoptera: Geometridae). – *Insect Syst.Evol.* 37: 351-360.
- Kaila, L. & Ståhls, G. (2006): DNA barcodes: Evaluating the potential of COI to differentiate closely related species of *Elachista* (Lepidoptera: Gelechioidea: Elachistidae) from Australia. *Zootaxa*, 1170, 1–26.
- Källersjö, M., Albert, V.A. & Farris, J.S. (1999): Homoplasy increases phylogenetic structure. *Cladistics*, 15, 91–93.
- Kambhampati, S., Luykx, P. & Nalepa C.A. (1996): Evidence for sibling species in *Cryptocercus punctulatus*, the wood roach, from variation in mitochondrial DNA and karyotype. *Heredity*, 76, 485–496.
- Kasten, F.H. (1980): Methods for fluorescence microscopy. In: Clark, G. (Ed.), *Staining Procedures*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 39–103.
- Keast, A. & Miller, S.E. (eds.) (1996): *The origin and evolution of Pacific Island Biotas, New Guinea to Eastern Polynesia: patterns and processes*. Leiden, The Netherlands: Backhuys.

- Keppel, G., Hodgskiss, P. & Plunkett, G.M. (2008): Cycads in the insular Pacific: dispersal or vicariance? *J. Biogeogr.* 35, 1004–1015.
- Klompen, J.S.H., Black IV, W.C., Keirans, J.E. & Norris, D.E. (2000): Systematics and biogeography of hard ticks, a total evidence approach. *Cladistics*, 16, 79–102.
- Klots, A.B. (1930): A generic revision of the Eucloini (Lepidoptera, Pieridae), *Bull. Brooklyn Ent. Soc.* 25, 80-95.
- Klots, A.B. (1931): A generic revision of the Pieridae (Lepidoptera), together with a study of the male genitalia (1), *Ent. Am.* 12 (3), 139-204.
- Klots, A.B. (1933): A generic revision of the Pieridae (Lepidoptera), together with a study of the male genitalia (2), *Ent. Am.* 12, (4), 205-242, 9 pls.
- Kluge, A.G. & Wolf, A.J. (1993): Cladistic: What's in a word? *Cladistics*, 9, 183–199.
- Knebelberger, T. & Bohn, H. (2003): Geographic parthenogenesis in the subaptera-group of *Phyllodromica* (Blattoptera, Blattellidae, Ectobiinae). *Insect Systematics and Evolution*, 34 (4), 427–452.
- Knölke, S., Erlacher, S., Hausmann, A., Miller, M. A. & Segerer, A. H. (2005): A procedure for combined genitalia dissection and DNA extraction in Lepidoptera. *Insect Syst. Evol.*, 35(4): 401-409.
- Koçak, A. Ö. (1996): Belucistan`in (Pakistan) Papilionoidea ve Hesperioidea faunasi üzerine arařtırmalar (Lepidoptera). – *Priamus*, Ankara 7 (4): 121-156.
- Kodandaramaiah, U. & Wahlberg, N. (2007): Out-of-Africa origin and dispersal mediated diversification of the butterfly genus *Junonia* (Nymphalidae: Nymphalinae). *J. Evol. Biol.* 20, 2181–2191.
- Kodandaramaiah, U. & Wahlberg, N. (2009): Phylogeny and biogeography of *Coenonympha* butterflies (Nymphalidae: Satyrinae) – patterns of colonization in the Holarctic. – *Systematic Entomology*, (Blackwell) London 34: 315-323.
- Korshunov, Y.P. & Gorbunov, P.Y. (1995): Butterflies of the Asian part of Russia. Ural University Press, Ekaterinburg [in Russian].
- Kreike, J. & Kampfer, S. (1999): Isolation and characterization of human DNA from mosquitoes (Culicidae). *Int. J. Legal Med.* 112, 380–382.
- Kress, J.W., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., & Janzen, D.H. (2005): Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8369–8374.
- Krüger, M. (2001): A revision of the tribe Macariini (Lepidoptera: Geometridae: Ennominae) of Africa, Madagascar and Arabia. *Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. (Entom.)*. Vol.70. No.1. P.1–502.
- Kruse, J.J. & Sperling, F.A.H. (2001): Molecular phylogeny within and between species of the *Archips argyrospila* complex (Lepidoptera: Tortricidae). *Annals of the Entomological Society of America* 94: 166-173.
- Kruse, J.J. & Sperling, F.A.H. (2002): Phylogeny of nearctic species of the *xylosteara* group of *Archips* Hübner (Lepidoptera: Tortricidae) based on combined analysis of morphological and mitochondrial DNA data sets. *Annals of the Entomological Society of America* 95: 288-301.
- Lafranchis, T. (2004): Butterflies of Europe. New Field Guide and Key. Diatheo, Paris.
- Landry, B., Powell, J.A. & Sperling, F.A. (1999): Systematics of the *Argyrotaenia franciscana* (Lepidoptera: Tortricidae) species group: Evidence from mitochondrial DNA. *Annals of the Entomological Society of America* 92 (1): 40-46
- Larsen, T.B. (1974): The butterflies of Lebanon. – Beirut, Lebanon (National Council for Scientific Research); 255 S.

- Larsen, T.B. (1983): Insects of Saudi Arabia – Lepidoptera; Rhopalocera – (A Monograph of the Butterflies of the Arabian Peninsula) – Fauna of Saudi Arabia, Vol. 5, 354-355.
- Larsen, T.B. (1984): Butterflies of Saudi Arabia and its Neighbours: 33-34, 108-109. Stacey International, London.
- Larsen, T.B. (1990): The Butterflies of Egypt. Apollo Books/ The American University in Cairo Press.
- Layberry, R.A., Hall, P.W. & Lafontaine, J.D. (1998): The butterflies of Canada. Univ. Toronto Press, Toronto, Ont. 280 pp., 32 pls.
- Lee, M.S.Y. (2002): Online database could end taxonomic anarchy. *Nature* 417: 787-788.
- Leestmanns, R. (2004): La notion biologique de l'espèce et les problèmes des taxa allopatriques: questions d'un amateur. *Linneana Belgica* 19 (6), 279-283.
- Leestmanns, R. (2005): Le refuge caspien et son importance en biogéographie. *Linneana Belgica* 20 (3), 97-102.
- Léfebure, T., Douady, C.J. Gouy, M. & Gibert, J. (2006): Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 435-447.
- Leys, R., Cooper, S.J.B. & Schwarz, M.P. (2002): Molecular phylogeny and historical biogeography of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: Apidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 77, 249–266.
- Lieftnick, M.A. (1962): On the problem of intrinsic and adaptive characters in Odonate larvae. *Verhandlungen des XI. Internationalen Entomologen Kongresses, Wien* (3): 274-278.
- Lindahl, T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715.
- Lipscomb, D.L., Farris, J.S., Kañllersjö, M.J. & Tehler, A. (1998): Support, ribosomal sequences and the phylogeny of the eukaryotes. *Cladistics*, 14, 303–338.
- Lipscomb, D.L., Platnick, N. & Wheeler, Q. (2003): The intellectual content of Taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 65-66.
- Lukhtanov, V. & Lukhtanov, A. (1994): Die Tagfalter Nordwestasiens (Lepidoptera, Diurna). *Herbipoliana*, Band 3. Herausgeber: Dr. Ulf Eitschberger, Marktleuthen.
- Lukhtanov, V.A. & Shapoval, N.A. (2008): Detection of cryptic species in sympatry using population analysis of unlinked genetic markers. *Doklady Biological Sciences, Moskau* 423: 432-436.
- Mac Neill, N. (1967): Pedal combs of the larvae of dragonflies (Odonata). *Proceedings of the Royal Irish Academy. Vol. 65, Section B, No. 19:* 391-406.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. (1998): *MACCLADE*, analysis of phylogeny and character evolution, v. 3.08. Sunderland, MA: Sinauer.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor University, X, 545 S.
- Manley, W.B.L. & Allcard, H.G. (1970): *A field Guide to the Butterflies and Burnets of Spain*. Manchester (William Morris Press Ltd.); 192 S, 40 Farbtafeln.
- Maravalhas, E. (Hrsg.) (2003): *As Borboletas de Portugal – The Butterflies of Portugal. – Stenstrup* (Apollo Books); 455 S.
- Mardulyn, P., Whitfield, J.B., 1999. Phylogenetic Signal in the COI, 16S, and 28S genes for inferring relationships among genera of Microgastrinae (Hymenoptera: Braconidae): Evidence of a high diversification rate in this group of parasitoids. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12, 282–294.

- Matheson C.D., Müller G.C., Vernon K., Junnila A., Hausmann A., Miller M.A., Greenblatt C. & Schlein Y. (2008): A PCR method for detection of plant meals from the gut of insects. *Organisms, Diversity and Evolution* 7: 294-303.
- Maus, C., Peschke, K. & Dobler, S. (2001): Phylogeny of the Genus *Aleochara* inferred from mitochondrial cytochrome oxidase sequences (Coleoptera: Staphylinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 202-216.
- Maux, P. & Carsus J.-N. (2007): *Euchloe tagis* (Hübner, 1804) a la limite des départements du Tarn-et-Garonne et du Tarn. Description de la sous-espece nouvelle aveyronensis (Lepidoptera, Pieridae). *Lambillionea CVII*: 434-438.
- Maxmen, A.B., King, B.F., Cutler, E.B. & Giribet, G. (2003): Evolutionary relationships within the protostome phylum Sipuncula: a molecular analysis of ribosomal genes and histone H3 sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27, 489–503.
- May, R.M. (1988): How many species are there on earth? *Science* 241, 1441–1449.
- Mayr, E. (1942): *Systematics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press.
- Mayr, E. (1969): *Principles of Systematic Zoology*. New York: McGraw-Hill.
- Mayr, E. (1982): *The Growth of Biological Thought*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Mayr, E. & Ashlock, P.D. (1991): *Principles of Systematic Zoology*, zweite Ausgabe. New York: McGraw-Hill.
- Mayr, E. & Diamond, J. (2001): *The birds of northern Melanesia*, p. 492. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Meier, R. (1995): Cladistic analysis of the Sepsidae (Cyclorrhapha: Diptera) based on a comparative scanning electron microscopic study of larvae. *Syst. Entomol.* 20, 99–128. 270
- Meier, R. (1996): Larval morphology of the Sepsidae (Diptera: Sciomyzoidea), with a cladistic analysis using adult and larval characters. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 228, 1–147.
- Meier, R. (2008): DNA sequences in taxonomy: Empirical performance, opportunities, and pitfalls. – Abstract and lecture held at the EDIT workshop “Future trends in taxonomy”, 21.-23. 1. 2008 at Carvoeiro, Portugal.
- Meier, R. & Baker, R. (2002): A cladistic analysis of Diopsidae (Diptera) based on morphological and DNA sequence data. *Insect Syst. Evol.* 33, 325–336.
- Meier, R. & Pont, A.C. (2000): Family Sepsidae. In: *Manual of Palaearctic Diptera*, Appendix (L.Papp, B.Darvas, eds), pp. 367–386. Science Herald, Budapest.
- Meier, R. & Wiegmann, B.M. (2002): A phylogenetic analysis of Coelopidae (Diptera) based on morphological and DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 393–407.
- Memon, N., Meier, R., Manan, A., & Feng-Yi Su, K. (2006): On the use of DNA sequences for determining the species limits of a polymorphic new species in the stink bug genus *Halys* (Heteroptera: Pentatomidae) from Pakistan. *Systematic Entomology*, 31, 703–710.
- Metcalfe, I., Smith, J.M.B., Morwood, M. & Davidson, I.D. (2001): *Faunal and floral migrations and evolution in SE Asia*. Leiden, The Netherlands: Balkema.
- Meyer, C.P. & Paulay, G. (2005): DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *Public Library of Science, Biology* 3, e422 (10 S.).
- Mickevich, M.F. & Farris, J.S. (1981): Taxonomic congruence. *Syst. Zool.* 27, 143–158.
- Miller, E.E. (1913): Neue Rhopalocera aus Transkaukasien. *Deutsche entomologische Zeitschrift Iris*, Dresden 26 (1912)(4): 220-223.



- Miller, J.A. (2003): Assessing progress in systematics with continuous jackknife function analysis. *Syst. Biol.* 52, 55–65.
- Mironov, V. (2003): Larentiinae II (Perizomini and Eupitheciini). In: Hausmann A. (Ed.): *The Geometrid Moths of Europe*. Vol.4. P.1–463.
- Mitchell, A., Cho, S., Regier, J.C., Mitter, C., Poole, R.W. & Matthews, M. (1997): Phylogenetic utility of elongation factor-1 $\alpha$  in Noctuoidea (Insecta: Lepidoptera): the limits of synonymous substitution. *Molecular Biology and Evolution* 14: 381-390.
- Mogi, M. & Miyagi, I. (1989): Sugar feeding of *Topomyia pseudobarbus* (Diptera: Culicidae) in nature. *J. Med. Entomol.* 26, 370–371.
- Monteiro, A. & Pierce, N.E. (2001): Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and EF-1 $\alpha$  Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 264-281.
- Moore, J.S., Kelly, T.B., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Wallbanks, K.R. & Molyneux, D.H. (1987): Honeydew sugars in wild-caught *Phlebotomus ariasi* detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). *Med. Vet. Entomol.* 1, 427–434.
- Morrison, D.A. & Ellis, J.T. (1997): Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18S rDNAs of Apicomplexa. *Mol. Biol. Evol.* 14, 428–441.
- Muñoz Sario, M.G. (1995): *Mariposas Diurnas de la Provincia de Granada*. Rhopalocera. Alsur S. L. Armilla, Granada.
- Muraji, M., Nakahara, S. (2001): Phylogenetic relationships among fruit flies, *Bactrocera* (Diptera, Tephritidae), based on the mitochondrial rDNA sequences. *Insect Mol. Biol.* 10, 549–559.
- Myers, E. (1994): *Sequence Navigator, Version 1.0.1*. PE Applied Biosystems, Foster City, CA.
- Nalepa, C.A., Byers, G.W., Bandi, C. & Sironi, M. (1997): Description of *Cryptocercus clevelandi* from the Northwestern United States, molecular analysis of bacterial symbionts in fat body and notes on biology, distribution and biogeography. *Annals of the Entomological Society of America*, 90, 416–424.
- Nazari, V. (2003): *Butterflies of Iran*. National Museum of Natural History of the Islamic Republic of Iran, Tehran (Dayereh-Sabz); 568 S.
- Neall, V.E. & Trewick, S.A. (2008): The age and origin of the Pacific islands: a geological overview. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 3293–3308.
- Nekrutenko, Y., & Tshikolovets, V. (1997): A new species of the genus *Callophrys* (Lepidoptera, Lycaenidae) from Turkmenistan. *Journal of the Ukrainian Entomological Society, Kiev* 3 (2): 3–4 [in Ukrainisch].
- Niehuis, O., Hofmann, A., Naumann, C.M. & Misof, B. (2007): Evolutionary history of the burnet moth genus *Zygaena* Fabricius, 1775 (Lepidoptera: Zygaenidae) inferred from nuclear and mitochondrial sequence data: phylogeny, host-plant association, wing pattern evolution and historical biogeography. *Biological Journal of the Linnean Society, London* (Blackwell), 92: 501-520.
- Novelo-Guitierrez, R. & Gonzales-Soriano, E. (1985): Descripción de la nayade de *Cora marina* Selys, 1868 (Odonata, Polythoridae). *Folia entomologica Mexicana* 63: 5-12
- Novelo-Guitierrez, R. & Gonzales-Soriano, E. (2004): The larva of *Dythemis maya* Calvert, 1906 and a redescription of the larva of *D. sterilis* Hagen, 1861 with a key to the genus (Anisoptera: Libellulidae). *Odonatologica* 33 (3): 279-289
- Novotny, V. et al. (2007): Low beta diversity of herbivorous insects in tropical forests. *Nature* 448, 692–695.

- Nylander, J.A.A. (2004): MRMODELTEST v2. Uppsala, Sweden: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- O'Grady, P.M. & DeSalle, R. (2008): Out of Hawaii: the origin and biogeographic history of the genus *Scaptomyza* (Diptera, Drosophilidae). *Biol. Lett.* 4, 195–199.
- Okusu, A., Schwabe, E., Eernisse, D.J. & Giribet, G. (2003): Towards a phylogeny of chitons (Mollusca, Polyplacophora) based on combined analysis of five molecular loci. *Organisms Diversity Evol.* 3, 281–302.
- Olivares Villegas, J. & Back, W. (2004): *Euchloe tagis* (Hübner, [1804]) (Lepidoptera, Pieridae) en Andalousie et description d'une sous-espèce nouvelle. *Linneana Belgica, Pars XIX, n° 5*.
- Olivares, J. & Jimenez Gomez, J.L. (1996): *Euchloe bazae* Fabiano 1993 bona species. (Lepidoptera: Pieridae). *Linneana Belgica. Pars XV n° 5*: 191-202.
- Oliveira-Biener, U., Melzer, R.R. & Miller, M.A. (2010): *Pilumnus* Leach (Decapoda: Pilumnidae Samouelle) from Mediterranean and adjacent Atlantic waters: a COI analysis. *Invertebrate Systematics* 24 (2): 182-193.
- Opler, P.A. (1965): Studies on the Nearctic genus *Euchloe* (Pieridae: Lepidoptera). Masters Thesis, San Jose State University, San Jose, California, 172 pp., 12 pls.
- Opler, P.A. (1966a): Studies on the Nearctic *Euchloe*. 1. Introduction. *Journal of Research on the Lepidoptera* 5 (1): 39-40.
- Opler, P.A. (1966b): Studies on the Nearctic *Euchloe*. 2. Chronological review of the literature and bibliography. *Journal of Research on the Lepidoptera* 5 (1): 41-50.
- Opler, P.A. (1966c): Studies on the Nearctic *Euchloe*. 3. Complete synonymical treatment. *Journal of Research on the Lepidoptera* 5 (3): 185-190.
- Opler, P.A. (1966d): Studies on the Nearctic *Euchloe*. 4. Type data and type locality restrictions. *Journal of Research on the Lepidoptera* 5 (3): 191-195.
- Opler, P.A. (1970): Studies on the Nearctic *Euchloe*. 5. Distribution. *Journal of Research on the Lepidoptera* 7 (2): 65-86.
- Opler, P.A. (1971): Studies on the Nearctic *Euchloe*. 6. Systematics of adults. *Journal of Research on the Lepidoptera* 8 (4): 153-168.
- Opler, P.A. (1974): Studies on the Nearctic *Euchloe*. 7. Comparative life histories, hosts, and the morphology of immature stages. *Journal of Research on the Lepidoptera* 13 (1): 1-20.
- Opler, P. A. (1986): A new *Euchloe* (Pieridae) from northwestern Mexico. *Journal of the Lepidopterists' Society* 40 (3): 188-190.
- Opler, P.A. (1999): A field guide to western butterflies. Peterson Field Guide series. Houghton-Mifflin Co., Boston, 540 pp.
- Opler, P. A. (2008): Designation of Lectotype and synonymy for *Euchloe lotta* Beutenmuller (Lepidoptera: Pieridae). *Zootaxa* 1767: 67-68.
- Opler, P.A. & Clench, H.K. (1983): Studies on the Nearctic *Euchloe*. 8. *Euchloe olympia*. *Annals of the Carnegie Museum of Natural History* 52: 41-54.
- Opler, P.A. & Krizek, G.O. (1984): Butterflies east of the Great Plains: an illustrated natural history. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md., 294 pp., 54 pls.
- Opler, P.A., Lotts, K. & Naberhaus, T. (Koordinatoren) (2009): Butterflies and moths of North America. Bozeman, MT: Big Sky Institute. <http://www.butterfliesandmoths.org/> (Version 07092009).
- Opler, P.A., Pavulaan, H., & Stanford, R.E. (1995): Butterflies of North America. Jamestown, ND Northern Prairie Wildl. Res. Centre Home Page. Available from:

- <http://www.npwrc.usgs.gov/resource/distr/lepid/bflyusa/bflyusa.htm> (Version 17 AUG 2000).
- Opler, P.A. & Warren, A.D. (2003): Butterflies of North America. 2. Scientific names list for butterfly species of North America, north of Mexico. Contributions of the C.P. Gillette Museum of Arthropod Diversity.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L. & Hofreiter, M. (2004): Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* 38, 645–679.
- Palumbi, S.R. (1996): Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Hrsg.), *Molecular Systematics*, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 205–248.
- Pelham, J. (2008): Catalogue of the butterflies of the United States and Canada. *Journal of Research on the Lepidoptera* 40: xiv + 658 pp.
- Penny, D. & Hendy, M.D. (1985): The use of comparison metrics. *Syst. Zool.* 34, 75–82.
- Pérez de Gregorio, J.J. (1994): *Elphinstonia charlonia* Donzel, 1842, Pieridae nou per a la fauna catalana. *Butll. Soc. Cat. Lep.*, 74, 40-41.
- Pérez de Gregorio, J.J., Redondo, V.M. & Rondós i Cases, M. (1992): *Elphinstonia charlonia* (Donzel, 1842), género y especie nuevos para la fauna ibérica. *Zapateri Revta. aragon. ent.*, 1 (2), 13-16.
- Phillips, A.J. & Simon, C. (1995): Simple, efficient and nondestructive DNA extraction protocol for Arthropods. *Annals of the Entomological Society of America* 88: 281-283.
- Phillips, A., Janies, D. & Wheeler, W. (2000): Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, 317–330.
- Pierce, F.N. (1909): The genitalia of the group Noctuidae of the Lepidoptera of the British Islands. XII+88pp., 32 pls. Liverpool.
- Poinar H.N., Hofreiter M., Spoulding W.G., Martin P.S., Stankiewicz B.A., Bland H., Evershed R.P., Possnert G. & Pääbo S. (1998): Molecular coproscopy: Dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science*. Vol.281. P.402–406.
- Poinar, G.O. jr., Poinar, H.N. & Cano, R.J. (1994): DNA from amber inclusions. Pp. 92-103 in: Herrmann & Hummel (Eds.) *Ancient DNA. Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens*. xi + 263 pp. New York.
- Polhemus, D.A. & Polhemus, J.T. (1998): Assembling New Guinea: 40 million years of island arc accretion as indicated by the distributions of aquatic Hemiptera (Insecta). In: R. Hall & J. D. Holloway (eds): *Biogeography and geological evolution of SE Asia*, pp. 327–340. Leiden, The Netherlands: Backhuys.
- Pollock, D.D., Watt, W.B., Rashbrook, V.K. & Iyengar, E.V. (1998): Molecular phylogeny for *Colias* butterflies and their relatives (Lepidoptera: Pieridae). *Annals of the Entomological Society of America* 91 (5), 524-531.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S., Sumlin, W.D. & Vogler, A. (2006): Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, Oxford University Press 55(4): 595-609.
- Pont, A.C. & Meier, R. (2002): The Sepsidae (Diptera) of Europe. *Fauna Entomologica Scand.* 37, 1–221.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9), 817–818.

- Prokopy, R.J. (1976): Feeding, mating and oviposition activities of *Rhagoletis fausta* flies in nature. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69, 899–904.
- Prokopy, R.J., Roitberg, B.D. & Averill, A.L. (1984): Chemical mediation of resource partitioning in insects. In: Carde, R.T. (Ed.), *The Chemical Ecology of Insects*. Chapman & Hall, London, pp. 301–330.
- Pruess, K.P., Adams, B.J., Parsons, T.J., Zhu, X. & Powers, T.O. (2000): Utility of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene for resolving relationships among black flies (Diptera: Simuliidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, 286–295.
- Pyle, R.M. (1995): *National Audubon Society: Field Guide to North American Butterflies*. – New York (Alfred A. Knopf) 10. Edition: 923 S.; 273 Farbtafeln.
- QIAGEN (2001): *MinElute™ Handbook for MinElute PCR Purification Kit, MinElute Gel Extraction Kit and MinElute Reaxtion Cleanup Kit*.
- QIAGEN (2003): *DNeasy® Tissue Handbook for DNA purification from animal tissues*.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2004): TRACER V1.4. See <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rambur, J.P. (1838): *Faune entomologique de l'Andalousie. Orthoptères*. Paris, 2: 12–94, 7 pl.
- Rand, D.B., Heath, A., Sudermann, T. & Pierce, N.E. (2000): Phylogeny and life history evolution of the genus *Chrysores* within the Aphnaeini (Lepidoptera: Lycaenidae), inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17: 85-96.
- Rehn, A.C. (2003): Phylogenetic analyses of higher-level relationships of Odonata. *Systematic Entomology* 28: 181-239
- Reissinger, E. (1990): Checkliste Pieridae Duponchel, 1835 (Lepidoptera) der Westpalaearktis (Europa, Nordwestafrika, Kaukasus, Kleinasien), *Atalanta* 20: 156-159.
- Retzlaff, H. (1978): Beobachtungen zu den Winterflugzeiten südwestpaläarktischer Lepidopteren mit einigen weniger beachteten Wanderfaltern. *Atalanta*, 9: 150-155.
- Riotte, J.C.E. (1969): Notes on *Euchloe ausonides mayi* (Pieridae) in Ontario. *J. Lepid. Soc.* 22 (1).
- Röber, J. (1907): In Seitz, A.: *Die Großschmetterlinge des Palaearktischen Faunengebietes*, 1: 51-53, pl. 20, 22. Fritz Lehmann's Verlag GmbH, Stuttgart.
- Röber, J. (1909): in Seitz, A.: *Die Gross-Schmetterlinge der Erde*. 5, p 96, fig. 28b. VOLUME 64, NUMBER 4: 13.
- Roberts, T.J. (2001): *The Butterflies of Pakistan*. – Karachi, Pakistan (Oxford University Press): 200 S., 66 Farbtafeln.
- Robinson, G.S. (1976): The preparation of slides of Lepidoptera genitalia with special reference to the Microlepidoptera. *Entomologist's Gazette* 27: 127-132.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003): MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.
- Ronquist, F. (1996): Dispersal–vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Syst. Biol.* 46, 195–203. (doi:10.2307/2413643)
- Rose, O.C., Brookes, M.I. & Mallet, J.L.B. (1994): A quick and simple nonlethal method for extracting DNA from butterfly wings. *Molecular Ecology* 3: 275.
- Roth, L.M. & Willis, E.R. (1956): Parthenogenesis in cockroaches. *Annals of the Entomological Society of America*, 49, 195–204.
- Roth, L.M. (1967): Sexual isolation in parthenogenetic *Pycnoscelus surinamensis* and application of the name *Pycnoscelus indicus* to its bisexual relative (Dictyoptera:

- Blattaria: Blaberidae: Pycnoscelinae). *Annals of the Entomological Society of America*, 60 (4), 774–779.
- Rothschild, W. (1917): Supplemental Notes to Mr. Charles Oberthür's Faune des Lepidoptères des la Barbarie, with Lists of the Specimens contained in the Tring Museum. *Nov. Zool.* 24: 80-85.
- SAGE (2009): Southeast Asian Gateway Evolution, an international Conference held at Royal Holloway. London, UK: University of London. ([www.sage2009.rhul.ac.uk/index.html](http://www.sage2009.rhul.ac.uk/index.html))
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanderson, M.J., Purvis, A. & Henze, C. (1998): Phylogenetic supertrees: Assembling the trees of life. *Trends Ecol. Evol.* 13, 105–109.
- Sandholm, H.A. & Price, R.D. (1962): Field observations on the nectar-feeding habits of some Minnesota mosquitoes. *Mosquito News* 22, 346–349.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.
- Sanmartín, I. & Ronquist, F. (2004): Southern Hemisphere biogeography inferred by event-based models: plant versus animal patterns. *Syst. Biol.* 53, 216–243.
- Sanmartín, I., van der Mark, P. & Ronquist, F. (2008): Inferring dispersal: a Bayesian approach to phylogeny-based island biogeography, with special reference to the Canary Islands. *J. Biogeogr.* 35, 428–449.
- Savela, M. (coordinator) (2006): *Euchloe*, part of the website: [www.nic.funet.fi/index/Tree\\_of\\_life/insecta/lepidoptera/ditrysia/papilionoidea/pieridae/pierinae/euchloe/index.html](http://www.nic.funet.fi/index/Tree_of_life/insecta/lepidoptera/ditrysia/papilionoidea/pieridae/pierinae/euchloe/index.html).
- Savolainen V., Cowan R.S., Vogler A.P., Roderick G.K., & Lane R. (2005): Towards writing the encyclopedia of life: An introduction to DNA bar-coding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B.* Vol.360. No.1462. P.1805–1811.
- SBN: Schweizerischer Bund für Naturschutz (1987): *Tagfalter und ihre Lebensräume. Arten, Gefährdung, Schutz.* Egg (K. Holliger Fotorotar), 516 S.
- Schlein Y. & Jacobson R.L. (1994): Mortality of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* caused by plant feeding of the sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol.50. P.20–27.
- Schlein Y. & Müller G. (1995): Assessment of plant tissue feeding by sandflies (Diptera: Psychodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entom.* Vol.32. P.882–887.
- Schmidt, B. C. & Sperling, F. (2008): Widespread decoupling of mtDNA variation and species integrity in *Grammia* tiger moths (Lepidoptera: Noctuidae). *Systematic Entomology*, Oxford University Press 33: 613-634.
- Schneider, D., Legal, L., Dierl, W. & Wink, M. (1999): Androconial hairbrushes of the *Syntomis (Amata) phegea* (L.) group (Lepidoptera, Ctenuchidae): A synapomorphic character supported by sequence data of the mitochondrial 16S rRNA gene. *Zeitschrift für Naturforschung* 54C: 1119-1139.

- Schneider, H., Kreier, H.-P., Hovenkamp, P. & Janssen, T. (2008): Phylogenetic relationships of the fern genus *Christiopteris* shed new light onto the classification and biogeography of drynarioid ferns. *Bot. J. Linn. Soc.* 57, 645–656.
- Scoble, M.J. (1995): *The Lepidoptera. Form, function and diversity.* xi + 404 pp., Oxford.
- Scoble, M.J. (1999): *Geometrid Moths of the World, a Catalogue: 1400 pp.*, CSIRO Publishing, Collingwood and Apollo Books, Stenstrup.
- Scott, J.A. (1974): Mate-locating behavior of butterflies. *American Midland Naturalist* 91(1): 103-117.
- Scott, J.A. (1986): *The butterflies of North America. A natural history and field guide.* Stanford University Press. Stanford, California, xv + 583 pp., 64 pls.
- Sedlmair, D., Gerstmeier, R. & Einspanier, R. (2000): Application of ubiquitin SSCP analysis in taxonomic studies within the subgenus *Orinocarabus* (Coleoptera: Carabidae: *Carabus*). *European Journal of Entomology* 97: 387-394.
- Seberg, O., Humphries, C.J., Knapp, S., Stevenson, D.Wm., Petersen, G., Scharff, N. & Moller Andersen, N. (2003): Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 63-65.
- Sennblad, B. & Bremer, B. (2000): Is there a justification for differential a priori weighting in coding sequences? A case study from rbcL and Apocynaceae s.l. *Syst. Biol.* 49, 101–113.
- Shevchuk, N.A. & Allard, M.W. (2001): Sources of incongruence among mammalian mitochondrial sequences: COII, COIII, and ND6 genes are main contributors. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21, 43–54.
- Shields, O. A. (1967): Hilltopping. *Journal of Research on the Lepidoptera.* 6(2): 69-178.
- Simmons, M.P. & Ochoterena, H. (2000): Gaps as characters in sequence based phylogenetic analyses. *Syst. Biol.* 49, 369–381.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. (1994): Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87 (6), 651–701.
- Sites, J.W. & Marshall, J.C. (2003): Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol.* 18: 462–470.
- Sorenson, M.D. (1999) *TreeRot*, Version 2. Boston University, Boston, MA.
- Sorenson, M.D. & Franzosa, E.A. (2007): *TREEROT*, v. 3. Boston, MA: Boston University.
- Speidel, W. & Mey, W. (1999): Catalogue of the Oriental Acentropinae (Lepidoptera, Crambidae). *Tijdschrift voor Entomologie* 142: 125-142.
- Speidel, W. (2003): New species of aquatic moths from the Philippines (Lepidoptera, Crambidae). *Insecta Koreana* 20: 7-49.
- Speidel, W., Buchsbaum, U. & Miller, M.A. (2005): A new *Paracymoriza* species from Lombok (Indonesia) (Lepidoptera, Crambidae). *Bonner Zoologische Beiträge* 53 (1/2): 227-234, Bonn.
- Sperling, F.A.H. & Hickey, D. (1995): Amplified mitochondrial DNA as a diagnostic marker for species of conifer-feeding *Choristoneura* (Lepidoptera: Tortricidae). *The Canadian Entomologist* 127(3): 277-288.
- Sperling, F.A.H. (2003a): DNA barcoding: Deus ex machina. *Newsletter of the Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods)* 22, 50-53.

- Sperling, F.A.H. (2003b): Butterfly molecular systematics: From species definitions to higher-level phylogenies. Kapitel 20: 431-458. In: Boggs, C. L., Watt, W. B. & Ehrlich, P. R. (Hrsg.) *Butterflies: Ecology and Evolution Taking Flight*. University of Chicago Press, Chicago.
- Stöck, M., Sicilia, A., Belfiore, A. M., Buckley, D., Lo Brutto, S., Lo Valvo, M. & Arculeo, M. (2008): Post-Messinian evolutionary relationships across the Sicilian channel: Mitochondrial and nuclear markers link a new green toad from Sicily to African relatives. *BioMedCentral Evolutionary Biology* 8:56.
- Stradomsky, B. V. (2005): A new subspecies of *Callophrys chalybeitincta* Sovinsky, 1905 (Lepidoptera: Lycaenidae) from the lower Don river. *Caucasian Entomological Bulletin*, 1(1): 85-86.
- Strobino, R. (1976): *Euchloe insularis* Staudinger. Bona species de Corse et Sardaigne. Étude comparative des especes françaises du genre *Euchloe*. *Entomops* 38: 203-210, Nice.
- Sturmbauer, C. & Meyer, A. (1992): Genetic divergence, speciation and morphological stasis in a lineage of African Cichlid fishes. *Nature*, Basingstoke (Macmillan Publishers) 358: 578-581.
- Swofford, D.L. (2003): PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J. & Hillis, D.M. (1996): Phylogenetic Inference. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics*, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 407–514.
- Symondson, W.O. (2002): Molecular identification of prey in predator diets. *Mol. Ecol.* 11, 627–641.
- Talbot, G. (1932-1935): Pieridae. In: Strand, E.: *Lepidopterorum Catalogus, Euchloe – Elphinstonia*. Pars 53: 291-301; 303-305. W. Junk, Berlin.
- Tarrier, M.R. & Delacre, J. (2008): *Les Papillons de jour du Maroc*. Publication Scientifiques du Museum Paris, 480 S.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H. & Vogler, A.P. (2002): DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature* 418, 479.
- Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R.H. & Vogler A.P. (2003): A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*. Vol.18. P.70–74.
- Tautz, D. 2006: Morphologie versus DNA-Sequenzen in der Phylogenie-Rekonstruktion. *Species, Phylogeny and Evolution* 1: 9-16.
- ten Hagen, W. & Eckweiler, W. (2000): Tagfalterbeobachtungen in Syrien (4. Beitrag) (Lepidoptera: Papilionoidea, Hesperioidea). *Nachr. entomol. Ver. Apollo*, N. F. 21 (2): 65-70.
- ten Hagen, W. (2006): Beitrag zur Kenntnis von *Callophrys mystaphia* Miller, 1913 (Lepidoptera: Lycaenidae). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo*, Frankfurt am Main, N.F. 27 (3): 131-137.
- ten Hagen, W. (2008): Beitrag zur Kenntnis des Genus *Callophrys* Billberg, 1820: eine neue Art aus Südiran (Lepidoptera: Lycaenidae). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo*, Frankfurt am Main, N.F. 29 (1/2): 9-14 und 27 (4): 181 (Corrigenda).
- ten Hagen, W. (2009): Mit *Onobrychis cornuta* (Fabaceae) assoziierte *Callophrys*-Arten: *Callophrys paulae* Pfeiffer, 1932 und *C. farsica* sp. n. (Lepidoptera: Lycaenidae). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo*, Frankfurt am Main, N.F. 30 (3): 131–142.

- Tennent, J. (1996): The butterflies of Morocco, Algeria and Tunisia. Wallingford (Gem Publishing Company), 252 S., 52 Farbtafeln.
- Thalmann, O., Hebler, J., Poinar, H.N., Pääbo, S. & Vigilant, L. (2004): Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes. - *Molecular Ecology* 13: 321-335.
- Thollessen, M. (2000): Increasing fidelity in parsimony analysis of dorid nudibranchs by differential weighting, or a tale of two genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, 161–172.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Tobolewski, J., Kaliszewski, M.J., Colwell, R.K. & Oliver Jr., J.H. (1992): Detection and identification of mammalian DNA from the gut of museum specimens of ticks. *J. Med. Entomol.* 29, 1049–1051.
- Tolman, T. & Lewington, R. (1997): *Butterflies of Britain and Europe: Collins Field Guide.* – London (Harper Collins Publishers): 320 S., 104 Farbtafeln.
- Trewick, S.A. & Cowie, R.H. (2008): Evolution on Pacific islands: Darwin's legacy. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 3289–3291.
- Tshikolovets, V.V. (1997): *The Butterflies of Pamir.* Bratislava, Slovakia (Slamka): 282 S., 46 Tafeln.
- Tshikolovets, V.V. (1998): *The Butterflies of Turkmenistan.* Kiev, Brno (Konvoj Ltd.): 237 S., 34 Tafeln.
- Tshikolovets, V.V. (2000): *The Butterflies of Uzbekistan.* Kiev, Brno (Konvoj Ltd.): 400 S., 49 Tafeln.
- Tshikolovets, V.V. (2003 a): *The Butterflies of Tajikistan.* Kiev, Brno (Konvoj Ltd.): 500 S., 77 Farbtafeln.
- Tshikolovets, V.V. (2003 b): *Butterflies of Eastern Europe, Urals and Caucasus, An Illustrated Guide.* Kiev, Brno (Konvoj Ltd.): 175 S., 47 Farbtafeln.
- Tshikolovets, V.V. (2005a): *The Butterflies of Kyrgyzstan.* Kiev, Brno (Konvoj Ltd.): 511 S., 108 Farbtafeln.
- Tshikolovets, V.V. (2005b): *The Butterflies of Ladak (N.-W. India).* Konvoj Ltd. Czech Republic. BRNO-KYIV.
- Tshikolovets, V.V., Bidzilya, O.V. & Golovoskin, M.I. (2002): *The Butterflies of Transbaikalia Siberia.* Konvoj Ltd. Czech Republic. BRNO-KYIV.
- Tuzov, V.K. (Hrsg.) (1997): *Guide to the Butterflies of Russia and adjacent territories, Volume I. Hesperidae, Papilionidae, Pieridae, Satyridae.* Pensoft Publishers, Sofia-Moscow.
- Tuzov, V.K., & Gorbunov, O.G. (Hrsg.) (1997): *Guide to the butterflies of Russia and adjacent territories (Lepidoptera, Rhopalocera), Bd. 1.* Sofia, Moskau (Pensoft); 480 S.
- Tuzov, V.K., Gorbunov, O.G. & Dantchenko, A.V. (Hrsg.) (2000): *Guide to the butterflies of Russia and adjacent territories (Lepidoptera, Rhopalocera), Bd. 2.* Sofia, Moskau (Pensoft); 580 S.
- Us, P. & Matvejev, S. (1967): Orthopteroidea. *Catalogus Faunae Jugoslaviae*, III/6, 1–43.
- van Oosterzee, P. 1997 *Where worlds collide. The Wallace Line.* Ithaca, NY: Cornell University Press.
- van Steenis, G.G.J. (1979): Plant-geography of East Malesia. *Bot. J. Linn. Soc.* 79, 97–178.



- Vandel, A. (1928): La parthénogenèse géographique. Contribution à l'étude biologique et cytologique de la parthénogenèse naturelle. Bulletin biologique de la France et de la Belgique, 62, 164–281.
- Verhulst, J.T. (2000): Les *Colias* du Globe. Monograph of the Genus *Colias*. Goecke & Evers, Keltern.
- Verity, R. (1908-1911): Rhopalocera Palaearctica: 172-185, pl. XXIX, XXXVI, XXXVII, XLIX, L, LIX, LXVII, LXVIII.
- Verity, R. (1947): Le Farfalle Diurne D'Italia, Vol. 3, Divisione Papilionida sezione Papilionina (Famiglie Papilionidae e Pieridae). Casa Editrice Marzocco, S. A., Firenze.
- Vodolazhsky, D.I., & Stradomsky, B. (2008): Phylogenetic analysis of subgenus *Polyommatus* (s. str.) Latreille, 1804 (Lepidoptera: Lycaenidae) based on mtDNA markers. Part II. Caucasian Entomological Bulletin 4(2): 237-242 (in russisch).
- von Haeseler, A. & Liebers, D. (2003): Molekulare Evolution. 127 S. Fischer Tachenbuch, Frankfurt.
- Wagener S. & van Oorschot, H. (1998): Rhopalocera and Gynocera of Turkey 15. Zur Identität von *Callophrys mystaphia* (Lepidoptera: Lycaenidae). Phegea, Antwerpen 26(2): 61-67.
- Wahl, D.B. (1984): An improved method for preparing exuviae of parasitic Hymenoptera. Entomological News 95: 227-228.
- Wahl, D.B. (1989): Further notes on preparation of exuviae of parasitic Hymenoptera. Entomological News 100: 181-182.
- Wahlberg, N. & Zimmermann, M. (2000): Pattern of phylogenetic relationships among members of the tribe Melitaeini (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. Cladistics 16: 347-363.
- Wakeley, J. (1996): The excess of transitions among nucleotide substitutions: New methods of estimating transition bias underscore its significance. Trends Ecol. Evol. 11, 158–163.
- Wallace, A.R. (1859): On the zoological geography of the Malay Archipelago (communicated by Charles Darwin to the LSL meeting of 3 November 1859). J. Proc. Linn. Soc. Lond. 4, 172–184.
- Wang, H.Y. (1995): Guide book to the Insects in Taiwan, 10 Brahmaeidae, Eupterotidae, Cycludiidae, Drepanidae, Notodontidae. Taipei: 237 pp.
- Warnecke, G. (1938): Über die taxonomische Bedeutung der Genitalarmatur der Lepidopteren. Verhandlungen des VII. Internationalen Kongresses für Entomologie 1938 I: 461-481, pl. 24-29.
- Warren, A.D., Llorente-Bousquets, J.E, Luis-Martinez, A. & Vargas-Fernandez, I. (2006): Interactive listing of Mexican butterflies. Listado Interactivo de las Mariposas Mexicanas. [11-VII-08] < <http://www.mariposasmexicanas.com/>>
- Warren, W. (1922/23): Drepanidae. In: A. Seitz (ed.): Die Großschmetterlinge der Erde 10: 909 pp. Stuttgart.
- Watson, A. (1957): A revision of the genus *Tridrepana* Swinhoe (Lepidoptera, Drepanidae). - Bull. Br. Mus. (nat. hist.) Entomology. London. 4 (9): 407 - 500, 2 pls.
- Watson, A. (1961): A taxonomic Study of some Indo-Australian Drepanidae (Lepidoptera). - Bull. Br. Mus. (nat. hist.) Entomology. London. 10 (8): 315 - 348, 2 pls.
- Watson, A. (1968): The taxonomy of the Drepanidae represented in China, with an account of their world distribution (Lepidoptera: Drepanidae). - Bull Br. Mus. (nat. hist.) Entomology, London: Suppl. 12: 1 - 151, 15 pls.

- Watson, J.D. & Crick, F.H. (1953): Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171 (4356): 737-738.
- Weidemann, H.-J. (1988): Tagfalter – Biologie, Ökologie, Naturschutz. Band 2. Melsungen (Neumann-Neudamm): 372 S.
- Weingartner, E., Wahlberg, N. & Nylin, S. (2006): Speciation in *Pararge* (Satyrinae: Nymphalidae) butterflies – North Africa is the source of ancestral populations of all *Pararge* species. *Systematic Entomology*, Oxford University Press 31: 621-632.
- Weller, S.J. & Pashley, D.P. (1995): In search of butterfly origins. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 235-246.
- Wenzel, J.W., & Siddall, M.E. (1999): Noise. *Cladistics*, 15, 51–64.
- Werner, F. (1927): Beiträge zur Kenntnis der Fauna Griechenlands. *Zoologischer Anzeiger*, 67, 135–151.
- Wheeler, Q.D. & Meier, R. (eds) (2000): Species concepts and phylogenetic theory. A debate. New York, NY: Columbia University Press.
- Wheeler, Q.D., Raven, P.H. & Wilson, E.O. (2004): Taxonomy-. impediment or expedient? *Science* 303: 285.
- Wheeler, W.C. (1993): The triangle inequality and character analysis. *Mol. Biol. Evol.* 10, 707–712.
- Wheeler, W.C. (1995): Sequence alignment, parameter sensitivity, and the phylogenetic analysis of molecular data. *Syst. Biol.* 44, 321–331.
- Wheeler, W.C. (1999): Measuring topological congruence by extending character techniques. *Cladistics*, 15, 131–135.
- Wheeler, W.C. & Hayashi, C.Y. (1998): The phylogeny of the extant chelicerate orders. *Cladistics*, 14, 173–192.
- Whitfield, J.B. & Cameron, S.A. (1994): Museum policies concerning specimen loans for molecular systematic research. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3: 268-278.
- Whiting, M.F., Carpenter, J.C., Wheeler, Q.D. & Wheeler, W.C. (1997): The Strepsiptera problem: Phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* 46, 1–68.
- Wichard, W. (1979): Zur Feinstruktur der abdominalen Tracheenkiemen von Larven der Kleinlibellen-Art *Epallage fatime* (Odonata: Euphaeidae). *Entomologia generalis* 5: 129-134.
- Wiemers, M. & Fiedler, K. (2007): Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology*, London (Biomed) 4 (8).
- Wilkinson, C. (1967 a): A taxonomic Study of the Genera *Ditrigona* Moore, *Teldenia* Moore and *Argodrepana* gen. n. (Lepidoptera: Drepanidae: Drepaninae). - Ph. D. London University: 336 pp.
- Wilkinson, C. (1967 b): A taxonomic revision of the genus *Teldenia* Moore (Lepidoptera: Drepanidae, Drepaninae). *Trans. R. ent. Soc. London.* 119 (11): 303 - 362, 4 pls.
- Wilkinson, C. (1972): The Drepanidae of Nepal (Lepidoptera). *Khumbu Himal, Ergebn. Forsch.-Unternehmen Nepal Himalaya, München.* 4 (2): 157 - 228.
- Wilkinson, M. (1994): Common cladistic information and its consensus representation: Reduced Adams and reduced cladistic consensus trees and profiles. *Syst. Biol.* 43, 343–368.
- Will, K.W. & Rubinoff, D. (2004): Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 20: 47-55.

- Will, K.W., Mishler, B.D. & Wheeler, Q.D. (2005): The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, Oxford University Press 54(5): 844-851.
- Wilson, E.O. (1961): The nature of the taxon cycle in the Melanesian ant fauna. *Am. Nat.* 95, 169–193.
- Wilson E.O. (2004): Taxonomy as a fundamental discipline. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B.* Vol.359. P.739.
- Winhard, W. (2000): Pieridae I Butterflies of the world, 10: (1), 40pp, (2) 48 pls.
- Woese, C.R. & Fox, G. (1977): Phylogenetic structure of the procaryotic domain: the primary kindoms. *PNAS* 74 (11): 5088-5090.
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L. (1990): Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (12): 4576-4579.
- Wyner, Y., DeSalle, R., Absher, R. (2000): Phylogeny and character behavior in the family Lemuridae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 15, 124–134.
- Yoder, A.D., Irwin, J.A. & Payseur, B.A. (2001): Failure of the ILD to determine data combinability for slow loris phylogeny. *Syst. Biol.* 50, 408–424.
- Yoder, A.D., Vilgalys, R. & Ruvolo, M. (1996): Molecular evolutionary dynamics of cytochrome beta in strepsirrhine primates: The phylogenetic significance of third-position transversions. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1339–1350.
- Zaidi, R.H., Jaal, Z., Hawkes, N.J., Hemingway, J. & Symondson, W.O. (1999): Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Mol. Ecol.* 8, 2081–2087.
- Zardoya, R., Meyer, A. (1996): Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* 13, 933–942.
- Zeller, P.C. (1855): Die Arten der Gattung *Butalis*. *Linnaea Entomologica* 10: 196-267.
- Zhang, Z. & Gerstein, M. (2003): Patterns of nucleotide substitution, insertion and deletion in the human genome inferred from pseudogenes. *Nucl. Acids Res.* 31, 5338–5348.
- Zhdanko, A. ([1996]): A new blue butterfly species of the genus *Callophrys* (Lepidoptera, Lycaenidae) from the Kopet Dagh. *Selevinia, Almaty 1996/1997*: 21–22 [in Russisch].
- Zhdanko, A. (1998): New blue butterfly species from the genera *Callophrys* Billb. and *Polyommatus* Latr. (Lepidoptera, Lycaenidae) from Asia and the Caucasus. *Vestnik Kazakh. State University, series biologica, Almaty 5*: 46–52 [in Russisch].
- Ziegler, H. (2005): Pieridae holarcticae, 364 S., 3755 images. [www.pieris.ch/pieridae.html](http://www.pieris.ch/pieridae.html).
- Zloty, J., Pritchard, G. & Esquivel, C. (1993): Larvae of the Costa Rican *Hetaerina* (Odonata: Calopterygidae) with comments on distribution. *Systematic Entomology* 18: 253-265.
- Zohary, M. (1966): *Flora Palaestina. Part I.* Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem.
- Zohary, M. (1972): *Flora Palaestina. Part II.* Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem.
- Zohary, M. (1973): *Geobotanical Foundations of the Middle East.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Zwickl, D. J. (2006): Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. PhD thesis, The University of Texas, Austin, TX.

Im Literaturverzeichnis sind sämtliche in der Dissertation und den daraus bisher entstandenen Vorveröffentlichungen zitierten Literaturstellen aufgeführt.

## 7. Weitere eigene Veröffentlichungen

Zusätzliche, teilweise nicht zu der vorstehenden Dissetration in Bezug stehende eigene Publikationen:

### 1998

- **Miller, M. A.** (1998): Eine Zucht von *Proserpinus proserpina* (Pallas, 1772) mit Anmerkungen zur Ökologie und Biologie (Lepidoptera, Sphingidae). Mitteilungen des Thüringer Entomologenverbandes e.V. 5 (1): 10-12.

### 1999

- **Miller, M. A.** & Hausmann, A. (1999): Catalogue of the type-specimens of the Sphingidae stored at the Zoologische Staatssammlung München (ZSM) (Insecta, Lepidoptera). SPIXIANA 22 (3): 209-243.

### 2000

- Nippe, B. (2000): Atlas der Raupen europäischer und kleinasiatischer Schmetterlinge. Hrsg. von Axel Hausmann und **Michael A. Miller**, MEG. - München: Pfeil.

### 2001

- Schliwen, U., Englbrecht, C, Rassmann, K, Klein, L., **Miller, M.A.** & Tautz, D. (2001): Molekulare und populationsökologische Charakterisierung autochthoner und durch Besatz beeinflusster Salmoniden-Populationen (Bachforelle, Alpen-Seesaibling) in Bayern. UBA Texte 48/01, S. 1-206. ISSN: 0722-186X.
- **Miller, M.A.**, Hausmann, A., & Trusch, R. (2001): The phylogenetic relationships in Geometrid moths. An approach using mitochondrial DNA (mtDNA) sequences (abstract). In: Hausmann, A. & Trusch, R. (eds.): Proceedings of the Forum Herbulot 2001. Neotropical Geometridae: Approaches to a modern concept of the Geometrid system on genus and tribe level (8.3.-9.3.2001). SPIXIANA 24 (3): 201-202.
- Hille, A., **Miller, M.A.** & G. Haszprunar (2001): DNATAX: DNA-Taxonomy as a Tool in Biodiversity Research: Recording, Assessment, Monitoring and Utilization of the Genetic Diversity of Eukaryont Systems. In: BMBF: BIOLOG Status Report 2001, 196-197.

### 2002

- **Miller, M.A.** (2002): Loricariiden aus dem oberen Rupununi River. DATZ 55 (1):54-55.
- **Miller, M.A.** (2002): Loricariiden aus dem Takutu River. DATZ 55 (2): 56-57.
- Buchsbaum, U. & **Miller, M.A.** (2002): *Cerace diehli* sp. n. from Sumatra (Indonesia) (Lepidoptera, Tortricidae, Tortricinae). Heterocera Sumatrana 12 (3) 155-163. ISSN 0724-1348
- Spies, M., Sublette, J.E., Sublette, M.F., Wülker, W.F., Martin, J., Hille,A., **Miller, M.A.**, and Witt, K. (2002): Pan-American *Chironomus calligraphus* Goeldi, 1905 (Diptera, Chironomidae): Species or complex? Evidence from External Morphology, Karyology, and DNA Sequences. Aquatic Insects, Vol. 24 (2): 91-113, ISSN 0165-0424

### 2003

- Haszprunar, G. & **Miller, M.A.** (2003): Neuordnung der Artenvielfalt durch DNA-Diagnostik? In: VDBIOL (Hrsg.): Fäden des Lebens, 191-196. ISBN: 3-9806803-3-9
- Haszprunar, G. & **Miller, M.A.** (2003): DNA-Taxonomie statt Borstenzählen oder Bütenzupfen? BIOforum 11: 724-726.
- **Miller, M.A.**, Hille, A., Bernhard, D., Erlacher, S., Witt, K. & Haszprunar, G. (2003): DNA-TAX, the establishment of DNA-based taxonomy in a research museum. In: PT-DLR Umweltforschung (Hrsg.): Biodiversity: Sustainable use and conservation of biological

diversity, a challenge for society. Symposium Report Part A, S.200-201. ISBN: 3-00-012577-9.

#### 2004

- **Miller, M.A.** & Schliewen, U. (2004): Die aktuelle Systematik der neuweltlichen Cichliden. In: Stawikowski, R. & Werner, U.: Die Buntbarsche Amerikas Bd. 3: Erdfresser, Hecht- und Kammbuntbarsche, S. 8-12. Stuttgart: Ulmer.

#### 2005

- Müller, G.C., Kravchenko, V., Li, C., Eitschberger, U., **Miller, M.A.**, Orlova, O., Speidel, W. & Witt, Th. (2005): The Sphingidae of Jordan: Distribution, Phenology and Ecology (Lepidoptera, Sphingidae). *Atalanta* 36 (1/2): 209-221.
- Müller, G.C., Kravchenko, V., Li, C., Eitschberger, U., Hausmann, A., **Miller, M.A.**, Orlova, O., Ortal, R., Speidel, W. & Witt, Th. (2005): The Hawk Moths of Israel: Distribution, Phenology and Ecology (Lepidoptera: Sphingidae). *Atalanta* 36 (1/2): 222-236.
- **Miller, M.A.** & Schliewen, U. (2005): Die molekulare Phylogenie der Gattung *Apistogramma*: Eine Arbeitshypothese. DATZ-Sonderheft Zwergcichliden: 22-23.
- **Miller, M.A.** & Schliewen, U. (2005): A molecular phylogeny of the genus *Apistogramma* – a working hypothesis. DATZ-Sonderheft Zwergcichliden: 24-25.
- Witt, T.J., Müller, G.C., Kravchenko, V.D., **Miller, M.A.**, Hausmann, A. & Speidel, W. (2005): A new *Olepa* species from Israel (Lepidoptera: Arctiidae). *Nachrichtenblatt der Münchner Entomologischen Gesellschaft* 54 (3/4): 101-115.

#### 2006

- Müller, G.C., Kravchenko, V.D., Speidel, W., Hausmann, A., Ortal, R., **Miller, M.A.**, Orlova, O.B. & Witt, T.J., (2006): Distribution, phenology, behaviour and issues of conservation of the Israel tiger moth, *Olepa schleini* Witt et al., 2005 (Lepidoptera: Arctiidae). *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft* 95: 19-29.
- Hausmann, A., **Miller, M.A.** & Müller, G.C. (2006): Molecular barcoding and larval gut content analysis in Geometridae. *SPIXIANA* 29 (3), 210-211.

#### 2007

- Erlacher, S., **Miller, M.A.** & Hille, A. (2007): DNA-Barcoding bestätigt „Pheromontypen“ im *Diachrysis chrysitis*-Komplex (Lepidoptera: Noctuidae). *Veröff. Museum für Naturkunde Chemnitz* 30: 107-116.

#### 2008

- **Miller, M.A.** & Schliewen, U.K. (2008): A DNA-based phylogenetic basis for the neotropical cichlid genus *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) (Abstract und Poster). 6. Tagung der Gesellschaft für Ichthyologie (GFI): 39. ISBN: 978-3-936616-53-8.

#### 2009

- Oliveira-Biener, U., **Miller, M.A.** & Melzer, R.R. (2009): Mediterranean *Pilumnus* (Crustacea: Brachyura: Xanthioidea: Pilumnidae): mtCOI vs. Taxonomy vs. Morphology? In: Richter, S., Møller, O.S. & Wirkner, Ch.S. (2009): 14. Crustaceologentagung der Universität Rostock vom 2.-5.4.2009, S. 146. (Poster & Abstract)

#### 2010

- Oliveira-Biener, U., Melzer, R.R. & **Miller, M.A.** (2010): *Pilumnus* Leach (Decapoda: Pilumnidae Samouelle) from Mediterranean and adjacent Atlantic waters: a COI analysis. *Invertebrate Systematics* 24 (2): 182-193.

