Einfluss von *Wolbachia*-Endosymbionten auf Populationsstruktur, prägame Isolation und Speziationsmechanismen bei *Altica lythri* AUBÉ, 1843 (Coleoptera, Chrysomelidae)

Dissertation
Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Regina Jäckel

aus Hamburg

Hamburg, im April 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Prof. Dr. S. DOBLER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. B. HAUSDORF
Tag der Disputation: 14. Januar 2011

Hamburg, den 30. Dezember 2010

A. Temming

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG 6

ZIELSETZUNG DER ARBEIT 8

1. EINLEITUNG 9

1.1. Allgemeine Anmerkungen zur Gattung *Altica* 9

1.2. Besondere Merkmale der Gattung *Altica* 10

1.3. *Altica lythri*: Eine der häufigsten Arten und ihre Besonderheiten 11

1.4. *Wolbachia*-Infektionen bei *Altica* 15

1.5. Cytoplasmatische Inkompatibilität: Speziation durch *Wolbachia*? 20

1.6. *Wolbachia*-Infektionen und mitochondrielle DNA 23

1.7. Untersuchungen zur Gattung *Altica* und zum Einfluss von *Wolbachia* 24
1.7.1. Einfluss von *Wolbachia*-Infektionen auf phylogenetische Muster: Bisherige Ergebnisse 24
1.7.2. Phylogenie, Populationen, Einfluss von *Wolbachia*: Weiterführende Untersuchungen 27
1.7.2.1. Analyse der Polyphylie: Mitochondrielle und nukleäre Daten 27
1.7.2.2. Phylogenetische Analyse des Taxons *Wolbachia* 29
1.7.2.3. Geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung von *Altica lythri* 30
1.7.2.4. Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität bei *Altica lythri* 31
1.7.2.5. Karyologische Untersuchungen zu Polyploidie 31

2. MATERIAL UND METHODEN 33

2.1. *Altica* und *Wolbachia*: Phylogenetische Untersuchungen 33
2.1.1. Vorbereitung der Proben 33
2.1.2. DNA-Extraktion und Amplifizierung 36
2.1.3. Sequenzierung 37
2.1.4. Phylogenetische Analyse 38

2.2. Geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung bei *Altica lythri* 40
2.2.1. Vorbereitung der Proben 40
2.2.2. DNA-Extraktion und Amplifizierung 41
2.2.3. Restriktionsanalyse (RFLP) und Auswertung der Daten 42

2.3. Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität 43
2.3.1. Aufzucht der Tiere für die Verpaarungsexperimente 43
2.3.2. Bestimmung der mtDNA-Haplotypen und der *Wolbachia*-Infektion 45
2.3.2.1. Vorbereitung der Proben und DNA-Extraktion 45
2.3.2.2. Amplifizierung der mtDNA (*COI*) und der bakteriellen Gene *ftsZ* und *wsp* 45
2.3.2.3. Restriktionsanalyse (RFLP) für *Altica-COI* und *Wolbachia-wsp* 46
2.3.3. Durchführung der Verpaarungsexperimente 47

2.4. Karyologische Untersuchung der Art *Altica lythri* 47

3. ERGEBNISSE 50

3.1. Phylogenetische Untersuchungen: Die drei Genome von *Altica lythri* 50
3.1.1. Die Phylogenie der Gattung *Altica* auf der Grundlage mitochondrieller Daten 50

3.1.1.1. Analyse der Sequenzen ... 50
3.1.1.2. Phylogenetische Beziehungen ... 51
3.1.2. Überprüfung der mitochondriellen Phylogenie mittels nukleärer Genabschnitte ... 56
3.1.2.1. EF1α-Intron ... 56
3.1.2.2. ITS2 ... 56
A Analyse der Sequenzen ... 57
B Vergleich der nukleären mit der mitochondriellen Phylogenie ... 59
C Probleme bei der Amplifikation von ITS2 ... 61
3.1.3. *Wolbachia*-Infektionen bei *Altica* ... 61
3.1.3.1. Analyse des *Wolbachia*-Infektionsstatus anhand von *ftsZ* ... 61
A Infektionsfrequenzen ... 63
B Analyse der *ftsZ*-Sequenzen ... 64
C Bestimmung der Infektionstypen ... 64
3.1.3.2. Vergleich der Phylogenien von *Altica* und *Wolbachia* ... 69
A Assoziation zwischen *Wolbachia*-Stamm und mtDNA bei *Altica lythri* ... 69
B Haplotyp, *Wolbachia*-Infektion und das Geschlechterverhältnis bei *Altica* ... 72
C Analyse auf Tendenzen zu Koevolution zwischen *Altica* und *Wolbachia* ... 73

3.2. Geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung bei *Altica lythri* ... **75**
3.2.1. Daten zur Häufigkeit von Männchen und Weibchen ... 75
3.2.2. Geographische Verteilung der Haplotypen ... 77
3.2.3. Der Zusammenhang zwischen Haplotyp und Geschlecht ... 83
3.2.4. Haplotyp-Netzwerk und Nachweis weiterer mtDNA-Varianten ... 87
3.2.5. Auflösung von "HT2" auf der Grundlage der Restriktionspolymorphismen ... 89

3.3. Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität ... **91**
3.3.1. Analyse von mtDNA und *Wolbachia*-Infektion der Muttertiere ... 91
3.3.1.1. Bestimmung der mtDNA-Haplotypen ... 92
3.3.1.2. Bestimmung des *Wolbachia*-Infektionstyps ... 94
3.3.2. Anzahl der Nachkommen ... 95
3.3.3. Mitochondrieller Haplotyp und Anteil männlicher Nachkommen ... 97
3.3.4. Ergebnisse der systematischen Verpaarungen ... 98
3.3.4.1. Verpaarungstypen: Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität ... 98
3.3.4.2. Infektionstypen: Produktivität und Fekundität der Weibchen ... 100
3.3.4.3. Prüfung auf Parthenogenese ... 103
3.3.4.4. Zeitliche Komponente ... 103

3.4. Karyologische Untersuchung der Art *Altica lythri* ... **104**

4 DISKUSSION ... 107

4.1. Phylogenetische Untersuchungen: Analyse der Polyphylie von *Altica lythri* ... **107**
4.1.1. Die Phylogenie der Gattung *Altica* auf der Grundlage mitochondrieller Daten ... 107
4.1.2. Polyphyletische Muster: Erklärungsansätze ... 108
4.1.2.1. Morphologische Merkmale ... 108
4.1.2.2. Die Probleme bei der Verwendung mitochondrieller DNA ... 110
4.1.2.3. Pseudogene ... 111
4.1.2.4. Unvollständiges "lineage sorting" ... 111
4.1.2.5. Rekombination und "paternal leakage" ... 112
4.1.2.6. Interspezifische Hybridisierung und Introgression von mtDNA ... 113
4.1.3. Phylogenetische Analyse der Gattung *Altica* auf der Grundlage von ITS2 ... 114
4.1.4. Hybridisierung als Ursache für Polyphylie ... 115
4.1.4.1. Zum Ursprung der bei *Altica lythri* gefundenen mitochondriellen Haplotypen ... 115
4.1.4.2. Weitere Hinweise auf interspezifische Hybridisierung ... 119

4.2. Analyse der *Wolbachia*-Infektion bei *Altica* ... **120**
4.2.1. *Wolbachia*-Infektionsstatus, Infektionsraten und Infektionstypen ... 120
4.2.2. *Wolbachia* bei *Altica lythri* ... 120
4.2.3. Unabhängiger Erwerb von *Wolbachia*-Infektionen anstelle von Coevolution ... 122
4.2.4. Einschränkung von Interpretationen bezüglich der Effekte von *Wolbachia* ... 124
4.2.4.1. Mehrfachinfektionen ... 124

4.2.4.2. Horizontaler Gentransfer und Integration von Genen ins Wirtsgenom ... 125
4.2.5. Hinweise auf von *Wolbachia* verursachte mtDNA-sweeps ... 126

4.3. Geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung bei *Altica lythri* ... **128**
4.3.1. Geschlechterverhältnisse ... 128
4.3.2. Verbreitung der Haplotypen ... 129

4.4. Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität ... **131**
4.4.1. Kompatibilität innerhalb von *Altica lythri* ... 131
4.4.2. Einflüsse auf die Ausprägung cytoplasmatischer Inkompatibilität ... 131

4.5. Andere Einflüsse von *Wolbachia* auf die Reproduktion ... **132**
4.5.1. Stamm wA1 ... 133
4.5.2. Stamm wA2 ... 137
4.5.3. Stamm wB ... 138

4.6. Der Einfluss anderer Bakterien ... **138**

4.7. Alternativen zur Erklärung des Geschlechterverhältnisses ... **139**

4.8. Mögliche Folgen des verschobenen Geschlechterverhältnisses für *Altica lythri* ... **140**

5. ZUSAMMENFASSENDE SCHLUSSFOLGERUNGEN ... **145**

LITERATUR ... **147**

ANHANG ... **164**

A RFLP-Daten der Populationen der Art *A. lythri* ... **164**

B Zucht *A. lythri*, kompletter Datensatz ... **172**

C Rezepte ... **175**

D Chemikalien und andere Substanzen ... **177**

DANKSAGUNG ... **178**

Zusammenfassung

Die Blattkäfergattung *Altica* (Chrysomelidae, Alticinae) weist in vielen Populationen verschiedener Arten ein stark verschobenes Geschlechterverhältnis mit einem deutlichen Mangel an Männchen auf. Die vorliegende Arbeit belegt, dass verschiedene Arten mit drei klar unterscheidbaren Stämmen endoparasitischer *Wolbachia*-Bakterien infiziert sind. Diese maternal vererbten Bakterien sind allgemein bekannt für ihre Fähigkeit, die Reproduktion ihrer Wirte zu manipulieren. Sie rufen cytoplasmatische Inkompatibilität, Feminisierung, Parthenogenese oder Male Killing hervor. Die bei *Altica* nachgewiesenen Stämme könnnen den beiden *Wolbachia*-"supergroups" A und B zugeordnet werden. Bis auf wenige Ausnahmen weist hierbei jede Art nur einen Stamm (bezeichnet als wA1, wA2 und wB) auf.

Ziel dieser Arbeit war es, zu klären, ob bei *Altica* ein durch *Wolbachia* bedingter direkter Einfluss auf das Geschlechterverhältnis, etwa durch Male Killing, vorliegt. Es sollte auch Hinweisen nachgegangen werden, dass die Bakterien direkt oder indirekt phylogenetische Beziehungen beeinflusst haben könnten, indem sie eine Rolle bei Artbildung sowie bei Hybridisierung und Introgression gespielt haben könnten. Ausgangspunkt hierfür ist die polyphyletische Gruppierung der Art *A. lythri* in der mitochondriellen Phylogenie (*COI/II*-Sequenzen) der Gattung. Die Art weist, auch innerhalb einiger Populationen, drei wesentliche mtDNA-Haplotypen (HT1, HT2 und HT3) sowie einige abgewandelte Varianten auf. Zwischen HT1, HT2 und HT3 fanden sich Sequenzunterschiede von 2,1 bis 4,6 % (p-Distanzen), die die Divergenz zu anderen Arten zum Teil weit übertreffen. Eine Überprüfung der mitochondriellen Phylogenie unter Verwendung eines neutralen nukleären Markers (ITS2) gibt die polyphyletische Gruppierung der Art *A. lythri* nicht in dieser Form wieder, jedoch erweist sich die erzielte Auflösung als zu gering, um eindeutige Aussagen treffen zu können. Der Vergleich der mtDNA-Phylogenie mit der Phylogenie der diese Individuen infizierenden *Wolbachia*-Bakterien (*ftsZ*-Sequenzen) zeigt eine klare Assoziation jedes Haplotyps der Art *A. lythri* mit jeweils einem *Wolbachia*-Stamm. Eine Infektion mit dem Stamm wA1 trat nur in Verbindung mit HT1 auf; der Stamm wA2 wurde ausschließlich bei Individuen des Haplotyps HT2 nachgewiesen; Stamm wB fand sich ausschließlich assoziiert mit HT3. Die Konstanz der Assoziation ist ein Hinweis darauf, dass zumindest zwei der *Wolbachia*-Stämme gemeinsam mit der jeweils assoziierten mtDNA mittels Hybridisierung die Artgrenzen überschritten haben. Interspezifische Hybridisierung und Introgression von mtDNA können auch die Polyphylie der Art *A. lythri* am sinnvollsten erklären. Um das Vorhandensein der drei divergenten Haplotypen zu

erklären, muss jedoch von mehr als einem Introgressionsereignis ausgegangen werden. Es spricht alles dafür, dass die sich ausbreitenden *Wolbachia*-Stämme den unterschiedlichen mtDNA-Haplotypen über wiederholte "selective sweeps" zu einer weiten Verbreitung verholfen haben.

Eine umfassende geographische Untersuchung von 14 Populationen der Art *A. lythri* unterstützt die Annahme, dass der Mangel an Männchen ein allgemeines Phänomen ist. Die mittels RFLP durchgeführte Analyse der Haplotypenverteilung zeigt das Auftreten der drei Haplotypen HT1, HT2 und HT3 sowie der Varianten HT1* und HT2* bei zahlreichen Populationen und bestätigt eindeutig, was die phylogenetische Analyse andeutet: Individuen der Haplotypen HT1 und HT1* sind immer weiblich, während bei den Haplotypen HT2, HT2* und HT3 das Geschlechterverhältnis ausgeglichen ist. In dem Maße, in dem die Häufigkeit der Haplotypen in den Populationen variiert, nehmen sie Einfluss auf das Geschlechterverhältnis: Populationen, die einen hohen Anteil HT1 und/oder HT1* aufweisen, sind durch einen hohen Anteil Weibchen gekennzeichnet; je mehr Individuen HT2, HT2* oder HT3 aufweisen, desto ausgeglichener ist das Verhältnis. Aufgrund der Assoziation zwischen HT1 und dem *Wolbachia*-Stamm wA1 weist dieses Ergebnis auf einen Einfluss von wA1 auf das Geschlechterverhältnis hin.

Anhand einer gezielten Nachzucht sollte *A. lythri* auf das Auftreten cytoplasmatischer Inkompatibilität zwischen den unterschiedlichen Infektionstypen getestet werden. Der Test erbrachte keinen Hinweis auf Isolation, welche als Hinweis auf einen durch *Wolbachia* bedingten Speziationsmechanismus gedeutet werden könnte. Es konnte jedoch der eindeutige Nachweis erbracht werden, dass Weibchen mit dem Haplotyp HT1, die mit dem *Wolbachia*-Stamm wA1 infiziert sind, die alleinige Ursache für das gestörte Geschlechterverhältnis sind. Es konnte gezeigt werden, dass diese Weibchen ausschließlich weibliche Nachkommen hervorbringen, während die Nachkommen von Weibchen des Haplotyps HT2 ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis aufweisen. Daher ist die bislang sinnvollste Erklärung für den beobachteten Weibchenüberschuss in einer Einflussnahme des Stammes wA1 zu sehen. Signifikant höhere Eizahlen bei Weibchen, die mit dem *Wolbachia*-Stamm wA1 infiziert waren, bei andererseits im Vergleich mit allen anderen Weibchen gleicher Nachkommenzahl könnten als Hinweis auf Male Killing gedeutet werden. Es bedürfte jedoch weiterer Untersuchungen, um die Ursachen und die genauen Zusammenhänge in der Beziehung zwischen *Altica* und *Wolbachia* endgültig zu klären.

Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit umfasst die Aufklärung der evolutionären Beziehungen zwischen der Blattkäfergattung *Altica* und den sie infizierenden *Wolbachia*-Bakterien (auf die Einzelheiten wird in Abschnitt 1.7 eingegangen). Hierbei wird auf Ergebnissen aufgebaut, die im Zuge zweier Diplomarbeiten zur Phylogenie der Blattkäfergattung *Altica* und zu Charakteristika der Infektion mit *Wolbachia* erhalten wurden (R. Jäckel 2005, D. Mora 2006; Abschnitt 1.7.1). Diese Arbeiten behandelten die Frage, ob die Phylogenie der Käfer Aufschluss geben könnte über die Tragweite einer Infektion mit *Wolbachia*, insbesondere hinsichtlich einer Beeinflussung der Populationsstrukturen und der Evolutionsdynamik der mitochondriellen DNA der Wirte. Auf der anderen Seite wurden auch erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Infektion und einem zugunsten der Weibchen verschobenen Geschlechterverhältnis erhalten. Die genannten Untersuchungen ließen vermuten, dass die Infektion mit *Wolbachia* und möglicherweise auch cytoplasmatische Inkompatibilität für die beobachteten Anomalien der Populationsstruktur in Bezug auf die mtDNA verantwortlich sein könnten (Abschnitte 1.5 und 1.6).

Das sich aus diesen Ergebnissen ergebende Ziel war zum einen, durch eine unabhängige, auf nukleären Gensequenzen basierende Phylogenie der Gattung *Altica* zu überprüfen, ob es bei *A. lythri* durch interspezifische Hybridisierung zu einem horizontalen Transfer eines mtDNA-Haplotyps mit seiner assoziierten *Wolbachia*-Infektion gekommen ist (Abschnitte 1.7.2.1 und 1.7.2.2). Eine umfangreiche geographische Analyse sollte zusätzlich klären, ob die Verteilung bestimmter mtDNA-Haplotypen sowie das verschobene Geschlechterverhältnis bei *A. lythri* ein allgemeines Phänomen darstellt (Abschnitt 1.7.2.3). Zum anderen sollte experimentell überprüft werden, ob Individuen mit unterschiedlichen *Wolbachia*-Stämmen durch cytoplasmatische Inkompatibilität reproduktiv isoliert sind, die Bakterien also Einfluss auf Artbildungsvorgänge nehmen könnten (Abschnitt 1.7.2.4).

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Anmerkungen zur Gattung *Altica*

Flohkäfer der Gattung *Altica* GEOFFROY, 1762 (früher: *Haltica*) gehören zur Unterfamilie Alticinae innerhalb der Familie Chrysomelidae (Blattkäfer). Es handelt sich um relativ kleine, auffallend glänzende, pflanzenfressende Käfer (Abb. 1), die auf zahlreichen, unterschiedlichen Familien angehörenden Pflanzenarten vorkommen; jedoch ist der Großteil der Arten mono- oder oligophag (Tab. 1). Die Gattung *Altica* ist in Europa durch 26 Arten vertreten; diese werden mitunter in weitere Unterarten und ökologische Formen weiter unterteilt. Weltweit sind mehr als 300 Arten dieser Gattung bekannt.

Kennzeichnend für die gesamte Unterfamilie Alticinae sind die stark verdickten Hinterschenkel, die, in Ruheposition seitlich vom Tier abstehend, unmittelbar ins Auge fallen (Abb. 3). Innerhalb befindet sich der sogenannte Maulik-Apparat (Maulik 1929), ein chitinisierter Körper, der als zusätzlicher Muskelansatzpunkt dient und ein Sprungorgan darstellt - daher die Bezeichnung der Unterfamilie als "Flohkäfer". Der Maulik-Apparat schafft somit die Grundlage für das gut ausgebildete Sprungvermögen, durch das die gesamte Unterfamilie ausgezeichnet ist und das weniger der Fortbewegung denn der Flucht vor potenziellen Fraßfeinden dient, denn die Käfer zeichnen sich zudem durch ein gut ausgebildetes Flugvermögen aus. Dank dieses Merkmals gehören Flohkäfer zu den leistungsfähigsten Springern nicht nur unter den Insekten, sondern im gesamten Tierreich (Furth et al. 1983).

Für das heimische Faunengebiet, das heißt für Deutschland, werden, wie oben angedeutet, unterschiedliche Artenzahlen innerhalb der Gattung *Altica* sowie einige möglicherweise existierende Formen und Unterarten (für *A. oleracea* beispielsweise eine sehr kleine Form, die auf *Helianthemum* frisst (*A. o.* f. *tyrolensis* (Siede 1998), und *A. quercetorum* mit zwei Unterarten, die morphologische Unterschiede aufweisen sollen; Mohr 1966) genannt. So nennt Siede (1998) 16 mitteleuropäische Arten, während Mohr (1966) lediglich 13 Arten aufführt. Letztlich können wohl für Deutschland 12 Arten mit Sicherheit mit Vorkommen angegeben werden (Tab. 1). Ob einige Arten, wie etwa die ausschließlich auf *Vitis* vorkommende *A. ampelophaga*, in der Vergangenheit aus der heimischen Fauna oder zumindest aus weiten Gebieten verschwunden sind (etwa *A. tamaricis*; aber vergleiche Reichholf 1974 zur Verbreitung und Häufigkeit dieser Art im Süden Deutschlands), kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden (Siede 1998).

Manche Arten sind morphologisch schwer voneinander zu unterscheiden, denn viele Merkmale weisen eine hohe intraspezifische Variabilität auf (Phillips 1979). Dies betrifft insbesondere äußere Merkmale wie die häufig herangezogenen Stirnhöcker und Stirnkiele (Abb. 5), die Oberflächenstruktur oder auch Schulterbeulen und die Ausprägung der Seitenkiele der Elytren. Kangas und Rutanen (1993) nennen weitere Merkmale wie etwa die Anzahl der Zähne an den Mandibeln als unbrauchbare Bestimmungsmerkmale. Nützliche Charakteristika bietet dagegen der Aedeagus der Männchen, jedoch auch Spermathek (Receptaculum seminis) und Merkmale der sekundären Genitalstrukturen (Styli und Spiculum ventrale) der Weibchen sind oftmals geeignet, um eine Artbestimmung durchzuführen. Diese weisen jedoch mitunter entweder innerhalb einer Art eine hohe Variabilität auf (insbesondere das Spiculum), oder aber die Unterschiede zwischen den Arten sind sehr gering; sicherer ist hier auf jeden Fall die Betrachtung aller drei Strukturen (also Spermathek, Styli und Spiculum ventrale) in Kombination, um ein Individuum einer

Tab. 1 Die zwölf in Deutschland nachgewiesenen *Altica*-Arten mit Angabe der jeweiligen Fraßpflanzenarten beziehungsweise Pflanzengattungen. Zusammengestellt nach Doguet (1994), Mohr (1966) und Siede (1998), Auflistung der Fraßpflanzenarten ergänzt durch eigene Beobachtungen. *An welcher Pflanze *A. carinthiaca* frisst, ist offenbar ungeklärt.

Art	**Fraßpflanze**
Altica aenescens WEISE, 1888	*Betula*-Arten
Altica brevicollis FOUDRAS, 1860	*Corylus avellana*
Altica carinthiaca WEISE, 1888	*Polygonum aviculare*?*
Altica ericeti ALLARD, 1859	*Erica*-Arten
Altica helianthemi ALLARD, 1859	*Helianthemun*-, *Sanguisorba*-, *Potentilla*-Arten
Altica impressicollis REICHE, 1862	*Epilobium hirsutum*, *E. tetragonum, Lythrum salicaria, Eupatorium cannabinum*
Altica longicollis ALLARD, 1860	*Empetrum nigrum*, *Calluna vulgaris* (?)
Altica lythri AUBÉ, 1843	v.a. *Epilobium*-Arten, insbes. *E. hirsutum*, *Oenothera biennis*, selten auf *Lythrum salicaria*. Weitere Angaben siehe Text.
Altica oleracea LINNÉ, 1758	*Oenothera, Epilobium, Fuchsia*, *Polygonum, Cirsium, Corylus avellana, Quercus*
Altica palustris WEISE, 1888	*Epilobium-Arten, Lythrum salicaria*
Altica quercetorum FOUDRAS, 1860	*Quercus robur* (und andere Arten)
Altica tamaricis SCHRANK, 1785	*Salix*- und *Populus*-Arten, *Hippophae rhamnoides, Myricaria germanica*

Art korrekt zuordnen zu können. Zusätzlich sollte die Bedeutung der Kenntnis der Futterpflanze, auf der das betreffende Individuum gefunden wurde, nicht unterschätzt werden, denn sie ist als Anhaltspunkt zur Artbestimmung überaus nützlich, zumal viele Arten als mono- oder oligophag bekannt sind und man in Zweifelsfällen auf diese Information zurückgreifen kann - hierauf weist auch Mohr (1966) explizit hin.

1.2. Besondere Merkmale der Gattung *Altica*

Die Gattung *Altica* ist bekannt für eine teilweise starke Verschiebung des Geschlechterverhältnisses in vielen, interessanterweise aber nicht allen Populationen vieler

Arten: Sie weist oft einen starken und manchmal auch dramatischen Überschuß an weiblichen Tieren auf (Kangas & Rutanen 1993, Mohr 1966, Siede 1998 und eigene Beobachtungen). Die Gründe hierfür konnten bisher nicht geklärt werden; ob dieses Phänomen mit parthenogenetischer Fortpflanzung in Verbindung zu bringen ist, wurde für heimische Arten bisher nicht nachgewiesen. Eine Ausnahme stellt nur die in Nordamerika vorkommende Art *A. lazulina* LECONTE, 1857 dar, welche einen triploiden Chromosomensatz aufweist (Smith 1960). Diese Art zeigt thelytoke parthenogenetische Fortpflanzung, erzeugt also - zumindest unter Laborbedingungen - ausschließlich weibliche Nachkommen. Allerdings scheint diese Art im Freiland dennoch bisexuell zu sein, denn dort wurden offenbar männliche Individuen nachgewiesen (Hatch 1971, Furth 1994).
Hoffmann et al. (2008) nennen in ihrer Analyse der Häufigkeit von Parthenogenese bei Landwirtschaftsschädlingen auch die Gattung *Altica* und erwähnen eine Art als parthenogenetisch, geben jedoch nicht an, um welche es sich hierbei handelt. Da prinzipiell parthenogenetische Fortpflanzung bei Käfern - oft im Zusammenhang mit polyploiden Chromosomensätzen - bekannt ist (Smith 1971, Smith & Virkki 1978, Suomalainen et al. 1987, Normark 1996, Lachowska et al. 2008), kann diese Möglichkeit zur Erklärung für den hohen Anteil weiblicher Individuen in vielen Populationen heimischer *Altica*-Arten natürlich nicht von vornherein ausgeschlossen werden. Auf der anderen Seite wird das starke Ungleichgewicht zwischen Männchen und Weibchen mitunter damit begründet, dass die Männchen im Frühjahr deutlich früher die Überwinterungsplätze verlassen, sich mit den Weibchen paaren und danach zugrunde gehen, so dass Männchen nur für einen sehr kurzen Zeitraum vorhanden wären, hernach folglich größtenteils weibliche Individuen zu finden sind - jedoch sollte man dann erwarten, dass im Laufe des Sommers, wenn die Imagines der nächsten Generation erscheinen, wieder mehr Männchen vorhanden sind (zu genaueren Angaben zur Lebensweise siehe Abschnitt 1.3). Vorab sei hier angemerkt, dass dies nicht der Fall ist.

1.3. *Altica lythri*: Eine der häufigsten Arten und ihre Besonderheiten

Während die Seltenheit männlicher Individuen bei *Altica* ein seit langem bekanntes Phänomen darstellt, fand sich mit der phylogenetischen Analyse der Gattung *Altica* eine weitere Besonderheit. Die Rekonstruktion der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Gattung zeigte das überraschende Ergebnis, dass die häufige und in ganz Deutschland weit verbreitete Art *A. lythri* auf der Ebene ihrer mitochondriellen DNA-Sequenzen nicht als monophyletische Gruppe dargestellt werden kann (R. Jäckel, Diplomarbeit 2005). Mittels

DNA-Sequenzierung fanden sich bei *A. lythri* - populationsübergreifend - zwei klar unterschiedliche mitochondrielle Haplotypen (basierend auf den Sequenzdaten von Abschnitten der Cytochrom-c-Oxydase Untereinheiten I und II (*COI/II*, etwa 1700bp; Abb. 9). Während die anderen *Altica*-Arten im Wesentlichen gut abgegrenzte monophyletische Gruppierungen bilden, ist bei *A. lythri* die Zuordnung der Individuen zu mtDNA-Haplotypen (HT) nicht mit der Artzuordnung in Übereinstimmung zu bringen. Diese Besonderheiten führten dazu, dass die intensive Untersuchung der Art *A. lythri* zum wichtigsten Thema der vorliegenden Arbeit wurde.

Altica lythri AUBÉ, 1843 (Abb. 1 A, Abb. 3) ist eine vergleichsweise große *Altica*-Art mit einem weiten Verbreitungsgebiet - soweit die Datenlage eine Angabe der Verbreitung zulässt, reicht sie von Westen nach Osten von Spanien bis ins westliche Russland, von Norden nach Süden von Finnland bis Italien und Griechenland (Quelle: http://www.faunaeur.org). Zumindest die heimischen Populationen dieser Art sind oft sehr individuenreich und aufgrund der weiten Verbreitung ihrer Fraßpflanzen überall im Gebiet zu finden (zur Verbreitung der Art in Norddeutschland: Tolasch & Gürlich 2010). *A. lythri* frisst an Pflanzen der Familie Onagraceae (Nachtkerzengewächse), vornehmlich auf *Epilobium hirsutum* (Zottiges Weidenröschen), kann gelegentlich jedoch auch auf *Oenothera*-Arten (Nachtkerze) sowie anderen Arten der Gattung *Epilobium* wie *Epilobium palustre* (Sumpf-Weidenröschen) gefunden werden. Kangas & Rutanen (1993) geben *E. montanum* (Berg-Weidenröschen) als Fraßpflanze an. Doguet (1994) nennt als weitere Fraßpflanzen zudem auch *Epilobium* (*Chamaenerion*) *angustifolium* (Schmalblättriges Weidenröschen), *Circaea lutetiana* (Großes Hexenkraut), *Ludwigia palustris* (Sumpf-Ludwigie, Sumpfheusenkraut) und *Lythrum salicaria* (Gewöhnlicher Blutweiderich) sowie einige kultivierte Onagraceae wie *Fuchsia* (Fuchsien), *Clarcia* (Atlasblume, Mandelröschen), *Boiduvalia* und *Eucharidium* (Eucharidie), außerdem einige Rosaceae wie *Rosa canina* (Hundsrose) sowie *Vitis vinifera* (Weinrebe). Bevorzugt wird jedoch sowohl von den Larven als auch den Adulten sowie zur Ablage der Eier die Art *Epilobium hirsutum* (Phillips 1977). Unabhängig von der jeweils besuchten Fraßpflanze verursachen adulte *Altica* jedweder Art einen deutlichen Lochfraß in den Pflanzenblättern (Abb. 1 A), während die Larven zunächst das Blattgewebe zwischen den Blattadern fressen und mitunter eine der Cuticularschichten stehenlassen (Abb. 1 C).

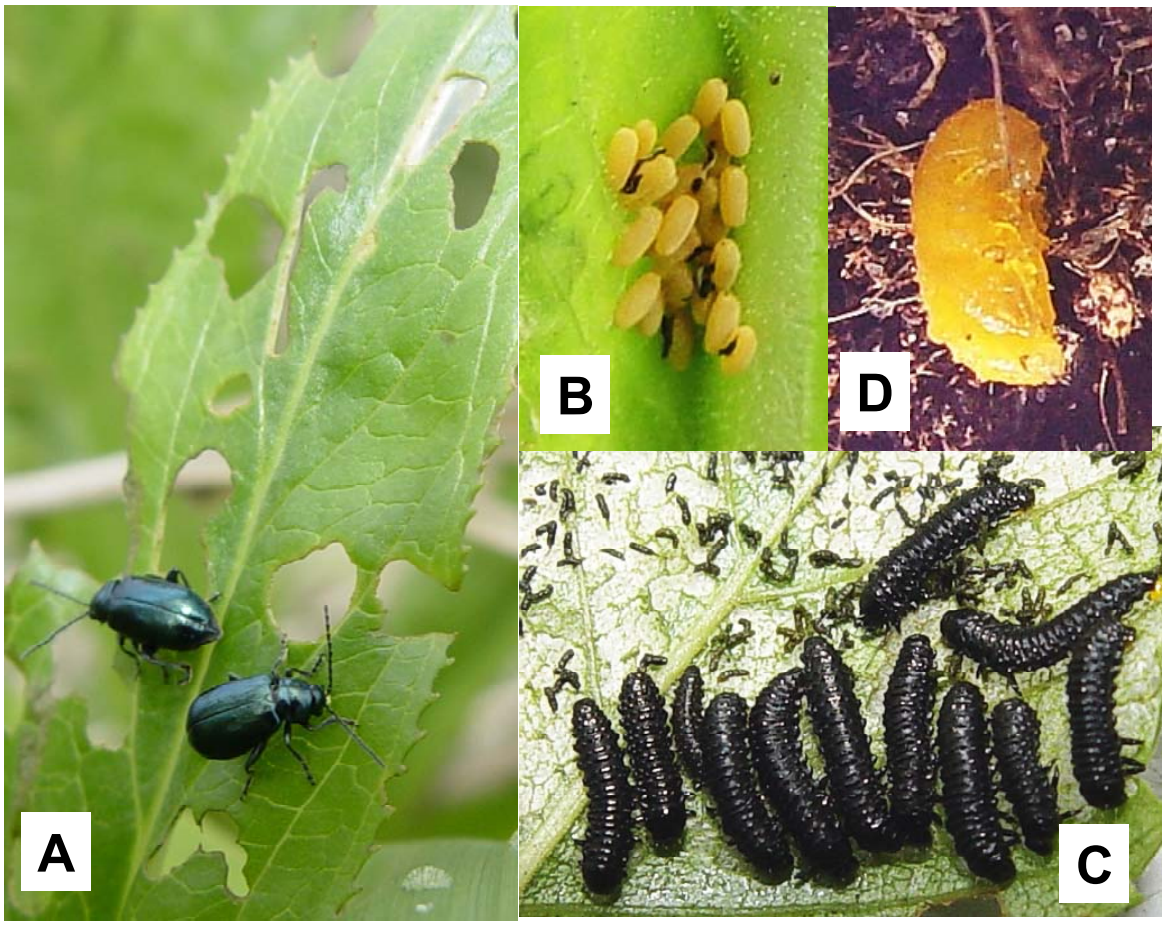

Abb. 1 A Zwei Exemplare der Art *Altica lythri* auf einem Blatt ihrer Fraßpflanze *Epilobium hirsutum*, das bereits den typischen Lochfraß aufweist. **B** Eier der Art *A. lythri* auf der Unterseite eines Blattes von *E. hirsutum*. **C** Halbwüchsige Larven der Art *A. aenescens* auf einem Blatt ihrer Fraßpflanze, *Betula*. Die schwarze Färbung weist auf die nahende Häutung der Tiere hin. **D** Puppe der Art *A. ericeti* (D).

Die Individualentwicklung von *A. lythri* sowie auch aller anderen Arten findet größtenteils auf der jeweiligen Fraßpflanze statt. Die Imagines überwintern in der Streuschicht und paaren sich im Frühling auf den neu austreibenden Pflanzen oder auf in der Umgebung wachsenden oder abgestorbenen Pflanzen. Hierbei kann es, vor allem im zeitigen Frühling, zu Massenansammlungen kommen, die schon aus einiger Entfernung gut sichtbar sind. Die Ablage der hellgelben Eier (Abb. 1 B) erfolgt an geschützten Stellen auf den Pflanzen, in erster Linie auf der Blattunterseite entlang der Blattnerven, in den Blattachseln oder, seltener, am Stengel. Die hellbraunen Larven schlüpfen ein bis zwei Wochen später. Junge Larven fressen zwischen den Blattnerven, meist von der Oberseite her, und lassen dann die

Abb. 2 Zwei ältere Larven der Art *A. lythri* an *Epilobium hirsutum.*

Cuticula der Blattunterseite sowie die Blattnervatur stehen (Abb. 1 C), ältere Larven verzehren das gesamte Blatt, verschmähen aber auch Knospen, Blüten und zarte Teile der Stengel nicht (Abb. 2). Die Pflanzen werden bei starkem Befall nicht selten bis auf die Sproßachse kahlgefressen. Kurz vor der Verpuppung wandern oder fallen die nun etwa 15 mm langen, dunkelbraunen Larven zum Erdboden, um sich dort in selbstgegrabenen Erdkammern zu verpuppen. Der Schlupf der Imagines aus den leuchtend orangegelben Puppen (Abb. 1 D) erfolgt wenige Wochen später. Die Käfer erklettern dann die mittlerweile in die Höhe gewachsenen Pflanzen und fressen dort bis zum Herbst Blätter, Knospen und Blüten, bevor sie sich zur Überwinterung wieder in die Streuschicht zurückziehen.

Abb. 3 Größenvergleich zwischen einem weiblichen (links) und einem männlichen Exemplar der Art *A. lythri*. Die abgebildeten Tiere sind typische Vertreter ihrer Art.

Die Größe der Imagines ist variabel und wird mit 3,5 bis 5,0 mm Länge von Kopf- bis Abdomenspitze angegeben (Kangas & Rutanen 1993, Doguet 1994). Dabei sind männliche Individuen gewöhnlich deutlich kleiner und zierlicher als weibliche Tiere (Abb. 3), es kommen jedoch auch sehr kleine Weibchen vor, so dass die Körpergröße allein kein sicheres Unterscheidungskriterium darstellt. Männliche und weibliche Individuen lassen sich jedoch sehr einfach anhand leicht erkennbarer Merkmale schon mit bloßem Auge unterscheiden (Abb. 4). Betrachtet man die Abdomenspitze von der Ventralseite (letztes Abdominalsternit), so sieht man beim Männchen einen deutlichen Eindruck, der sich zur Abdomenspitze hin öffnet und mittig meist eine feine Kerbe aufweist (deutlich zu erkennen in Abb. 4). Das distale Ende des Sternits ist zudem abgeflacht und weitgehend unbehaart, während das Abdomen der Weibchen spitz zuläuft und mit zahlreichen, nach hinten abstehenden Haaren bedeckt ist.

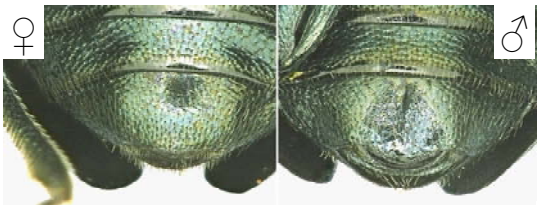

Abb. 4 Vergleich der Abdomenenden (ventral) einer weiblichen (links) und einer männlichen *A. lythri*.

Die Körperform ist bei beiden Geschlechtern länglich-oval und oberseits leicht bis deutlich abgeflacht. Diese Abflachung, die bei seitlicher Betrachtung sichtbar wird, ist insbesondere bei großen Weibchen ausgeprägt, bei Männchen hingegen kaum. Die Färbung ist sehr variabel und reicht von grün über grün-blau bis hin zu dunkelblau, mitunter bläulich-lila oder, selten, rötlich-kupferfarben. Das Pronotum kann von den Elytren farblich abgesetzt sein. Die Tiere glänzen schwach, mitunter aber auch stark und lassen sich insbesondere im Sonnenlicht auf Pflanzen oder Substrat leicht ausmachen, zumal sie meist auf der Oberseite der Blätter sitzen. Die Elytren sind in variabler Stärke und Dichte punktiert und weisen häufig mehr oder weniger stark ausgeprägte Andeutungen longitudinaler Leisten (Carinae) auf, die aber ebenso oft fehlen. Die weiblichen Individuen weisen in überwiegender Anzahl einen scharf vorspringenden Stirnkiel (Carina), auf jeder Seite flankiert von je einem flachen, rundlichen Stirnhöcker, auf (Abb. 5). In manchen Fällen ist der Stirnkiel jedoch bei Weibchen abgerundet beziehungsweise abgeflacht, bei Männchen offenbar immer (eigene Beobachtungen). Auch Kangas & Rutanen (1993) erwähnen, dass bei *A. lythri* zwei unterschiedliche Ausprägungen dieses Merkmals auftreten. Die Stirnhöcker, insbesondere ihre Form und der Grad ihrer Erhabenheit, sind zwar allein nicht für die Artbestimmung ausreichend, jedoch als sinnvolle Ergänzung zur Absicherung zu betrachten. Neben dem typischen Stirnkiel der Weibchen und der abgeflachten Körperform stellen sie ein wichtiges äußeres Merkmal dar.

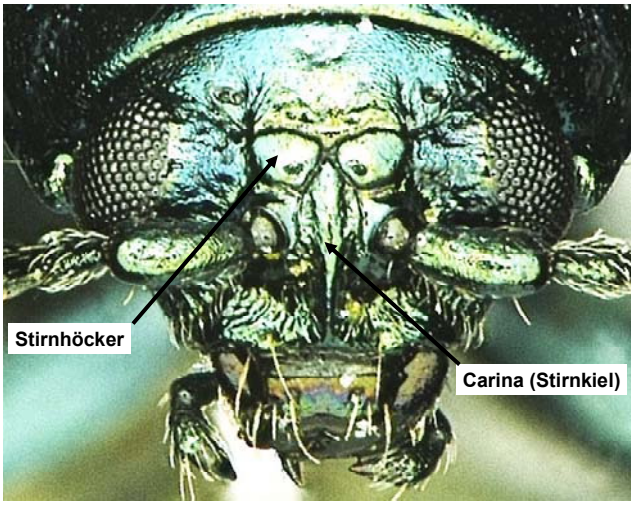

Abb. 5 Frontalansicht einer weiblichen *A. lythri* mit typisch ausgeprägten Stirnhöckern und charakteristisch scharf vorspringendem Stirnkiel.

1.4. *Wolbachia*-Infektionen bei *Altica*

Innerhalb der Gattung *Altica* konnte eine weit verbreitete Infektion vieler Arten mit Bakterien aus der Gruppe der *Wolbachia* nachgewiesen werden (D. Mora, Diplomarbeit 2006). *Wolbachia*, 1924 von Hertig & Wolbach in den Ovarien der Mücke *Culex pipiens* entdeckt (Hertig & Wolbach 1924) und 1936 von Hertig als *Wolbachia pipientis* beschrieben (Hertig 1936), weist insbesondere bei Insekten eine weite Verbreitung auf. *Wolbachia* gehört zur Gruppe der Rickettsiaceae, zu denen wahrscheinlich auch der

Vorgänger der Mitochondrien gehört. Es handelt sich um gram-negative α-Proteobakterien, die bei Insekten und anderen Arthropoden sowie bei Nematoden mit mehreren molekulargenetisch voneinander unterscheidbaren sogenannten "Supergroups", die weiter in Stämme unterteilt werden können, weit verbreitet sind. Zwar gehen die Schätzungen relativ weit auseinander, doch kann man davon ausgehen, dass zwischen 20% und zwei Drittel aller Insektenarten mit *Wolbachia* infiziert sind (Werren & Windsor 2000, Duron et al. 2008, Hilgenboecker et al. 2008). Hinzu kommen Nachweise von Springschwänzen (Collembola) und Cheliceraten (etwa Skorpione, Webspinnen und Milben). Während Wolbachien, die Nematoden infizieren, Mutualisten sind, stellen solche, die bei Arthropoden gefunden werden, eine große Gruppe parasitischer Formen; doch auch hier fanden sich in letzter Zeit vermehrt Hinweise auf Mutualismus und symbiontische Beziehungen zwischen Bakterium und Wirt (Dedeine et al. 2001, Dobson et al. 2002, Zchori-Fein et al. 2006, Weeks et al. 2007, Teixeira et al. 2008, Pike & Kingcombe 2009, Timmermans & Ellers 2009). Die Bakterien finden sich intrazellulär in erster Linie im Reproduktionsgewebe, aber auch in anderen Geweben ihres Wirts (und haben, je nachdem, in welchem Gewebe sie verbreitet sind, unterschiedliche Auswirkungen auf den Wirt; Saridaki & Bourtzis 2010); sie werden in maternaler Linie an die Nachkommen weitergegeben. Viele Stämme beeinflussen die Reproduktion ihrer Wirte in entscheidender Weise, indem sie bei ihrem Wirt einen von vier unterschiedlichen Phänotypen hervorrufen, die die Verbreitung der Bakterien fördern (siehe unten). Bisher wurden elf unterschiedliche *Wolbachia*-Supergroups (benannt von A bis K) aufgrund von Unterschieden in der DNA-Sequenz (in erster Linie augrund der bakteriellen Gene *ftsZ* und *wsp*) beschrieben (Baldo et al. 2006b, Werren et al. 2008, Bordenstein et al. 2009, Ros et al. 2009). FtsZ ("Filamenting temperature-sensitive mutant Z") ist ein Protein des prokaryotsichen Cytoskeletts; es spielt eine Rolle bei der Zellteilung, indem es weitere Proteine rekrutiert, die in der sich teilenden Zelle eine neue Zellmembran aufbauen. Es ist das Homologon zum eukaryotischen Tubulin, und seine Rolle ist analog der des Actin bei der Zellteilung bei Eukaryoten.

Wsp ("*Wolbachia* surface protein") ist ein Protein der äußeren Membran der Bakterien (Braig et al. 1998). Die genaue Fuktion ist unbekannt, doch gehört es zu einer Proteinfamilie (pfam0617), die beispielsweise an der Antikörper-Erkennung beteiligt ist (Noh et al. 2006), Antigen-Reaktionen beim Wirt auslöst (French et a. 1999) und das Eindringen in die Wirtszellen ermöglichen (Mohan Nair & Venkitanarayanan 2007). Es ist

also anzunehmen, dass Wsp bei *Wolbachia* eine Rolle im Zusammenhang mit der Infektion, der Vermehrung oder der Pathogenität spielt (Serbus et al. 2008).

Bei Arthropoden finden sich, basierend auf Sequenzen des *ftsZ*-Gens der Bakterien, in erster Linie die Supergroups A und B (Werren et al. 1995a), die vor etwa 58 bis 66 Millionen Jahren divergierten (Werren et al. 1995b). Bei Nematoden wurden die Supergroups C und D nachgewiesen (Bandi et al. 1998); E findet sich bei Springschwänzen (Collembola; Vandekerckhove et al. 1999, Czarnetzki & Tebbe 2004). Supergroup F ist von vielen sehr unterschiedlichen Taxa bekannt; so fand sich diese *Wolbachia*-Gruppe bei Blattodea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Isoptera, Neuroptera, Orthoptera und Phthiraptera unter den Insekten, wurde aber auch bei Cheliceraten sowie bei Nematoden der Art *Mansonella ozzardi* nachgewiesen (Casiraghi et al. 2001, Lo et al. 2002, Casiraghi et al. 2004, 2005, Dunn & Stabb 2005, Sakamoto et al. 2006, Baldo et al. 2007, Covacin & Barker 2007, Panaram & Marshall 2007, Vaishampayan et al. 2007). Supergroup G wurde ausschließlich aufgrund von *wsp*-Sequenzen als bei Spinnen vorkommend beschrieben (Rowley et al. 2004), jedoch fehlt hier die Bestätigung auf der Grundlage anderer *Wolbachia*-spezifischer Gensequenzen, und es wird vermutet, dass es sich um eine durch Rekombination zwischen A und B entstandene Variante handelt (Baldo & Werren 2007). H wiederum wurde ausschließlich bei Isoptera gefunden (Bordenstein & Rosengaus 2005). Eine mit I benannte Gruppe wurde bei Flöhen definiert, J wiederum ist von Nematoden bekannt, und K kommt bei Milben vor (eine detaillierte Übersicht bieten Ros et al. 2009). Zudem gibt es aber auch zahlreiche Berichte über doppelt und sogar dreifach infizierte Wirtsorganismen (Bordenstein & Werren 1998, Vavre et al. 1999). Hohe Infektionsraten sowohl auf Art- als auch auf Populationsebene heben hervor, wie erfolgreich die Gruppierung ist.

Interessanterweise gehört *Wolbachia*, genau wie Mitochondrien, zu den α-Proteobakterien. Sie existieren im Cytoplasma der Wirtszellen und werden genau wie die Mitochondrien ausschließlich maternal an die nächste Generation weitergegeben - abgesehen von selten auftretender paternaler Vererbung, die sowohl bei Mitochondrien als auch bei *Wolbachia* vorkommt (Lansman et al. 1983, Hoffmann & Turelli 1988, Satta et al. 1988, Hoffmann et al. 1990, Kondo et al. 1990, Turelli et al. 1992, Turelli & Hoffmann 1995). Daher hängt die Fitness der Bakterien davon ab, ob sie sich in einem weiblichen oder in einem männlichen Wirt befinden, und aufgrund der ausschließlich maternalen Weitergabe ist ihre Fitness in männlichen Wirten Null (Männchen stellen für die Bakterien also eine Sackgasse, ein "dead end" dar; Werren 1997a, McGraw & O'Neill 2004). Daher fördert *Wolbachia* die

Produktion weiblicher Wirte, erhöht also deren Fitness gegenüber nicht infizierten Weibchen, und verhindert oder reduziert die Produktion von Männchen. Dies ist auf verschiedenen Wegen (sogenannten Phänotypen) verwirklicht (Werren et al. 1995b), indem die Bakterien mit dem Reproduktionssystem des Wirtes interagieren (Stouthamer et al. 1999). Aus diesem Grund wird *Wolbachia* auch als reproduktiver Parasit oder als "selfish genetic element" bezeichnet (Hurst & Schilthuizen 1998).

Die Phänotypen, die beim jeweiligen Wirt zutage treten, hängen nicht zwangsweise vom jeweiligen *Wolbachia*-Stamm, sondern tendenziell offenbar eher vom genetischen Hintergrund des jeweiligen Wirtes ab. Das bedeutet, dass Verallgemeinerungen nicht möglich sind, wenn einmal der Phänotyp eines bestimmten Stammes in einem bestimmten Wirtsorganismus bekannt ist, da dieser, in einen anderen Wirt verbracht, einen ganz anderen Phänotyp hervorrufen kann (Reynolds et al. 2003, Jaenike 2007).

Die Einflussnahme von *Wolbachia* auf ihre Wirte umfasst vier unterschiedliche Phänotypen: Male killing, Feminisierung, Induktion von Parthenogenese und das Hervorrufen cytoplasmatischer Inkompatibilität.

Liegt Male-Killing (MK) vor, wird die Produktion männlicher Nachkommen verhindert oder zumindest deren Anzahl reduziert, indem männliche Embryonen absterben. Dieser Phänotyp wurde bei Pseudoskorpionen (Zeh et al. 2005, Zeh & Zeh 2006, Koop et al. 2009) sowie den Insektenordnungen Diptera (Hurst et al. 2000, Dyer & Jaenike 2004), Lepidoptera (Hurst et al. 1999b, Jiggins et al. 2000a, Dyson et al. 2002) und Coleoptera (Hurst et al. 1999b, Fialho & Stevens 2000) nachgewiesen. Einer der ersten Fälle von Erzeugung einer rein weibliche Nachkommenschaft sowie der Nachweis der maternalen Vererbung dieses Merkmals, welches nicht auf parthenogenetische Fortpflanzung zurückgeführt werden konnte, beobachtete H.W. Simmonds bereits in den 20er und 30er Jahren des 20. Jahrhunderts bei der Schmetterlingsart *Hypolimnas bolina* (Poulton 1923). Dyson et al. (2002) wiesen nach, dass es sich hier um einen Fall von Male Killing handelt, zurückzuführen auf eine Infektion mit *Wolbachia*.

Feminisierung als Folge einer Infektion mit *Wolbachia* kommt in erster Linie bei Isopoda (Crustacea) vor, wurde jedoch auch bei Insekten der Ordnungen Hemiptera und Lepidoptera nachgewiesen (Rousset et al. 1992, Juchault et al. 1994, Rigaud 1997, Rigaud et al. 1999b, Hiroki et al. 2002, Negri et al. 2006). Feminisierung ist die Umwandlung genetischer Männchen in funktionelle Weibchen und funktioniert wahrscheinlich über die Störung der Funktion von Hormondrüsen und somit der Produktion der Hormone, die für die Entwicklung männlicher Merkmale notwendig sind (Rigaud 1997, Vandekerckhove et

al. 2003). In diesem Zusammenhang ist auch das oben beschriebene Male Killing wahrscheinlich als eine Art „tödliche Feminisierung“ anzusehen, wenn die männlichen Embryonen die Umwandlung in Weibchen nicht überleben.

Ein dritter, auf einige wenige Insektenordnungen beschränkter Phänotyp, der auf die Wirkung einer Infektion mit *Wolbachia* zurückzuführen ist, ist die Induktion obligater (thelytoker) Parthenogenese (PI), also unisexueller Produktion ausschließlich weiblicher Nachkommen. Durch *Wolbachia* hervorgerufene thelytoke Parthenogenese wurde bisher ausschließlich bei Hymenoptera (Zchori-Fein et al. 1992, Stouthamer 1997, Plantard et al. 1998), Thysanoptera (Arakaki et al. 2001) sowie Acari (z.B. Weeks & Breeuwer 2001) nachgewiesen. Wo aus unbefruchteten Eiern männliche haploide Nachkommen hervorgehen, sind die Bakterien verantwortlich für eine rein weibliche Nachkommenschaft auf dem Wege der Gameten-Duplikation (Stouthamer & Kazmer 1994, Stouthamer 1997, Gottlieb et al. 2002, Pannebakker et al. 2004). Die Verdoppelung der Gameten erzeugt logischerweise homozygote Nachkommen (Suomalainen et al. 1987), und es kommt zu einer Reduktion der genetischen Variabilität in infizierten Populationen (Pannebakker et al. 2004). Möglicherweise ist eine von *Wolbachia* hervorgerufene parthenogenetische Fortpflanzung durch Gametenduplikation beschränkt auf haplodiploide Systeme (Cook & Butcher 1999, Stouthamer 1997, Stouthamer et al. 1999). Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass diese Einschränkung nicht unbedingt die Regel ist, denn anscheinend kann *Wolbachia* auch funktionell apomiktische Parthenogenese hervorrufen und könnte so prinzipiell für Fälle von Parthenogenese verantwortlich sein, die bei diplodiploiden Arthropoden auftritt (Weeks & Breeuwer 2001).

Diese durch *Wolbachia*-Infektionen hervorgerufenen Phänotypen dienen der Vermehrung der Bakterien, die sich somit als Parasiten definieren lassen. Es gibt jedoch *Wolbachia*-Wirt-Assoziationen, die als mutualistisch beschrieben werden. *Wolbachia*, die in Nematoden gefunden werden, gehören nicht nur anderen Bakterien-Stämmen an als diejenigen, die in Arthropoden gefunden werden, sondern scheinen zudem obligate Mutualisten zu sein (Taylor & Hoerauf 1999, Foster et al. 2005). Manche Untersuchungen deuten darauf hin, dass derartige Assoziationen auch bei Insekten vorkommen und die Bakterien in solchen Fällen für die Reproduktion der Wirte notwendig sind oder diese fördern (Dedeine et al. 2001, Dobson et al. 2002, Timmermans & Ellers 2009). *Wolbachia* kann beim Wirt die Fruchtbarkeit und die Überlebensrate erhöhen. So hat die *Wolbachia*-Infektion der Wespenart *Trichogramma bourarachae* nur einen bekannten Effekt: Sie steigert die Fruchtbarkeit von Weibchen auf das Doppelte (Girin & Boulétreau 1995, Vavre

et al. 1999). Auch ein Fall von Steigerung der Widerstandskraft des Wirtes (*Drosophila melanogaster*) gegen Viren ist bekannt (Teixeira et al. 2008). Die Evolution von vertikal weitergegebenen Parasiten hin zum Mutualisten macht insofern Sinn, als dass ihr Überleben in einer Population gesichert wird, denn Organismen, die ihrem Wirt Schaden zufügen, werden mit höherer Wahrscheinlichkeit eliminiert werden.
Auf welchem Wege die einzelnen Phänotypen ausgeprägt werden, das heißt, welche Mechanismen *Wolbachia* dazu in die Lage versetzen, derartig auffällige Merkmale hervorzurufen, ist weitgehend ungeklärt. Hinweise finden sich im Genom der Bakterien. So sind parasitische *Wolbachia*-Stämme durch das Vorhandensein von Phagen charakterisiert, die wiederum Ankyrin-Repeat-Proteine aufweisen. Diese Proteine könnten in die Wirtszellen exportiert werden und für Manipulationen der Reproduktion verantwortlich sein (Fenn & Blaxter 2006). Diese Phagen fehlen bei den mutualistischen *Wolbachia*-Stämmen, die bei Nematoden vorkommen.

Die phänotypischen Effekte von *Wolbachia* auf ihre Wirte lassen einen Zusammenhang zwischen der Infektion der Gattung *Altica* mit diesen Bakterien und dem bei manchen Arten beobachteten verschobenen Geschlechterverhältnis vermuten und bieten daher einen der Ansatzpunkte für die in dieser Arbeit angestrengten Untersuchungen zur Klärung des Phänomens des teilweise sehr hohen Weibchenanteils bei *Altica*.

1.5. Cytoplasmatische Inkompatibilität: Speziation durch *Wolbachia*?

Der Nachweis, dass *Wolbachia* die Ursache für inkompatible Paarungen, aus denen keine oder eine reduzierte Anzahl Nachkommen hervorgeht, sein kann, wurde 1971 erbracht (Yen & Barr 1971). Von allen vier bekannten Möglichkeiten der Einflussnahme von *Wolbachia* auf die Reproduktion des Wirtes ist von den Bakterien hervorgerufene cytoplasmatische Inkompatibilität (CI) die am häufigsten gefundene Variante. *Wolbachia* ruft auf diesem Wege reproduktive Einschränkungen bis hin zur reproduktiven Isolation zwischen Individuen, die entweder mit unterschiedlichen *Wolbachia*-Stämmen infiziert sind (bidirektionale Inkompatibilität) oder aber bei Paarungen zwischen infizierten Männchen und nicht infizierten Weibchen (unidirektionale Inkompatibilität), jedoch nicht zwischen infizierten Weibchen und nicht infizierten Männchen (Abb. 6); folglich ist die reproduktive Einschränkung asymmetrisch. Die Einflussnahme der Bakterien zielt also auf die Förderung und Vermehrung infizierter Weibchen der Wirtsart. Dieser Phänotyp wurde

bei Acari, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isopoda, Lepidoptera und Orthoptera nachgewiesen (Hoffmann & Turelli 1997, Werren et al. 2008).

Das Phänomen der cytoplasmatischen Inkompatibilität sowie die maternale Vererbung dieses Merkmals wurde erstmals 1952 bei *Culex pipiens*, also bei der gleichen Art, bei der *Wolbachia* erstmals entdeckt wurde, beschrieben (Ghelelovich 1952). Schließlich wurde die Infektion mit Bakterien der Gattung *Wolbachia* als Ursache für die Inkompatibilität bei *C. pipiens* erkannt (Yen & Barr 1971). CI funktioniert über zwei Komponenten: Im Männchen wird das Sperma durch die Anwesenheit der Bakterien während der Spermatogenese modifiziert ("mod"); beherbergt das Weibchen den gleichen *Wolbachia*-Stamm, "retten" diese Bakterien den sich entwickelnden Embryo vor den modifizierten Spermien ("resc"). Hierauf beruht das sogenannte *mod/resc*-Modell (siehe unten). Sind dagegen die Spermien modifiziert, das Weibchen aber beherbergt nicht den gleichen Stamm oder ist nicht infiziert, entwickelt sich der Embryo nicht (Werren 1997c).

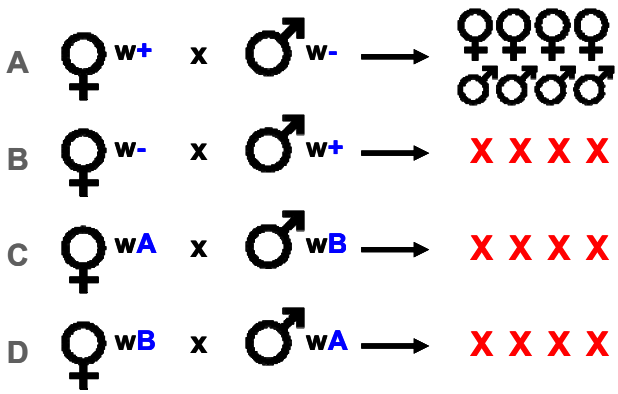

Abb. 6 Schematische Darstellung der Möglichkeiten des Auftretens cytoplasmatischer Inkompatibilität bei Verpaarungen zwischen Individuen mit unterschiedlichem Infektionsstatus. **A:** Keine Inkompatibilität zwischen infizierten Weibchen und nicht infizierten Männchen. **B:** Cytoplasmatische Inkompatibilität (keine Nachkommen) zwischen nicht infizierten Weibchen und infizierten Männchen. **C** und **D:** Inkompatibilität (keine Nachkommen) zwischen Individuen, die mit unterschiedlichen *Wolbachia*-Stämmen infiziert sind.

Cytoplasmatische Inkompatibilität ist bei *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera) und wahrscheinlich auch in allen anderen Fällen die Folge des sogenannten "delayed nuclear envelope breakdown" des männlichen Pronucleus (Tram & Sullivan 2002), was eine Asynchronität zwischen dem männlichen und dem weiblichen Pronucleus und letztlich den Verlust des paternalen Chromosomensatzes während der Mitose hervorruft (Reed & Werren 1995). Wenn allerdings im Ei ebenfalls Wolbachien (des gleichen Stammes) vorhanden sind, wird die Synchronität wieder hergestellt, was die Kompatibilität zwischen mit dem gleichen Stamm infizierten Wirten beziehungsweise zwischen infizierten Weibchen und nicht infizierten Männchen erklärt (mod/resc-System, Werren 1997c). *Wolbachia* wirkt offenbar gezielt auf die den Zellzyklus regulierenden Proteine ein. Dabei scheint der verspätet in die mitotische Teilung eintretende paternale Pronucleus der wichtigste Defekt bei von cytoplasmatischer Inkompatibilität betroffenen Embryonen zu sein. Die Unfähigkeit der paternalen Chromosomen, zu kondensieren, ist dann eine weitere

Konsequenz. Durch den Verlust des paternalen Chromosomensatzes ist der Embryo haploid und, bei diplo-diploiden Taxa, nicht lebensfähig (Callaini et al. 1997). Bei haplo-diploiden Taxa hingegen gehen aus solchen Paarungen ausschließlich männliche Nachkommen hervor. Die Folge der Lethalität der Zygoten, die von CI betroffen sind, ist eine reduzierte Nachkommenzahl beziehungsweise eine hohe Embryonensterblichkeit (O'Neill & Karr 1990). Also produzieren infizierte Weibchen, unabhängig davon, ob sie sich mit einem infizierten oder einem nicht infizierten Männchen paaren, mehr Nachkommen als nicht infizierte Weibchen, deren Nachkommen bei einer Paarung mit infizierten Männchen unter hoher Embryonensterblichkeit leiden. Die Folge ist, dass die Frequenz der *Wolbachia*-Infektion von einer Generation zur nächsten ansteigt (Turelli & Hoffmann 1995).

Evolutionsbiologisch und insbesondere hinsichtlich der Möglichkeit der Förderung von Artbildung ist die Induktion von cytoplasmatischer Inkompatibilität durch *Wolbachia* besonders interessant (O'Neill & Karr 1990, Shoemaker et al. 1999, Bordenstein et al. 2001, Bordenstein 2003). Da die Bakterien auf diesem Wege theoretisch

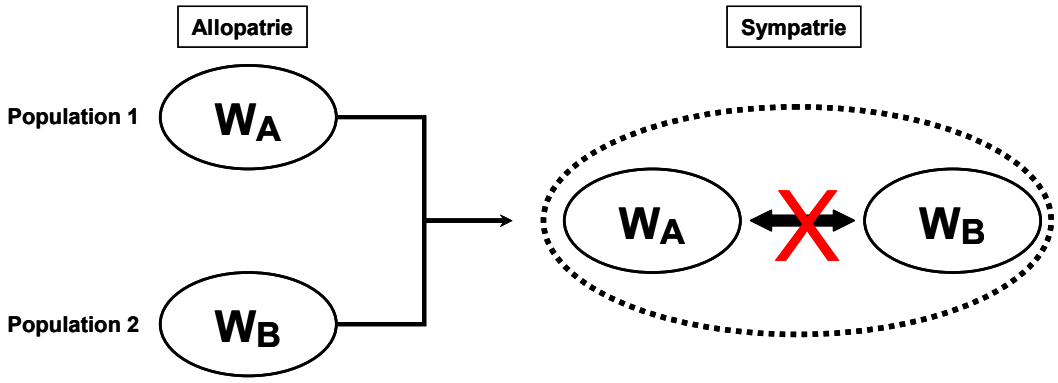

Abb. 7 Theoretischer Ablauf einer Artbildung durch Infektion zweier Populationen der gleichen Art (in Allopatrie) mit zwei unterschiedlichen, inkompatiblen *Wolbachia*-Stämmen. Gelangen die Gruppen wieder in Sympatrie, sind sie reproduktiv gegeneinander isoliert.

genetische Unterschiede zwischen Populationen, die einen unterschiedlichen Infektionsstatus aufweisen, hervorrufen können, könnten sie eine Ursache für reproduktive Isolation zwischen Populationen der gleichen Art darstellen (Abb. 7). Diese könnte sogar innerhalb ein und derselben Population ursächlich für eine Separation zwischen unterschiedlichen Infektionsgruppen sein. Wenn inkompatible Paarungen Genfluß zwischen Populationen verhindern, wären die Bakterien also die erste Ursache oder zumindest einer von vielen Faktoren für reproduktive Isolation (Werren 1997b, Rokas 2000, Bordenstein 2003, Telschow et al. 2005). Natürlich kann man dieses Szenario auch von der anderen Seite betrachten, wenn nämlich *Wolbachia* mittels Hervorrufung

cytoplasmatischer Inkompatibilität die Produktion hybrider Nachkommen verhindert (Trpis et al. 1981, Dean & Dobson 2004).

1.6. *Wolbachia*-Infektionen und mitochondrielle DNA

Die über die maternale Vererbung gekoppelte Weitergabe von Mitochondrien und *Wolbachia* hat weitreichende Konsequenzen, die sich auf die Verwendung mitochondrieller DNA für phylogenetische Analysen auswirken (Hurst & Jiggins 2005). Ungewöhnliche Populationsstrukturen, die auf der Ausbreitung von *Wolbachia*-Stämmen beruhen, können also potentiell durch die Verwendung von mtDNA-Sequenzen sichtbar gemacht werden. Wenn etwa die auf mitochondriellen Daten beruhende Phylogenie der Wirtsart in Übereinstimmung mit der Phylogenie der diese Wirte infizierenden Bakterien steht, kann man annehmen, dass *Wolbachia* zumindest auf der Ebene der Mitochondrien einen Einfluss auf die genetische Struktur der Wirte haben oder hatten (Narita et al. 2006). Die Assoziation zwischen einem mtDNA-Haplotyp und einem bestimmten *Wolbachia*-Stamm konnte oft nachgewiesen werden (Schulenburg et al. 2002, Jiggins 2003, Shoemaker et al 2003, Keller et al 2004). Da die Bakterien außerdem ihre eigene Verbreitung in einer Population des jeweiligen Wirtes fördern, beispielsweise über die Induktion cytoplasmatischer Inkompatibilität, wird sich eine Infektion innerhalb der Wirtspopulation ausbreiten, und sie wird denjenigen mtDNA-Haplotyp mit sich verbreiten, der mit dem zuerst infizierten Wirtsindividuum assoziiert war (Abb. 8). Eine derartige Infektionswelle bezeichnet man als "mtDNA-sweep", den Vorgang als "genetic hitchhiking" (Turelli et al. 1992, Rigaud et al. 1999a). Eine auf mitochondrieller DNA beruhende Phylogenie kann folglich sogar verwendet werden, um die Reihenfolge, in welcher unterschiedliche *Wolbachia*-Stämme Populationen ihrer Wirte infizierten, zu bestimmen (Schulenburg et al. 2002). Da nur eine geringe Anzahl von Mitochondrien von einigen wenigen Gründerindividuen, die den Ursprung eines "sweep" darstellen, abstammt, wird die Diversität der Mitochondrien in einer neu infizierten Population reduziert sein (Baudry et al. 2003).

Interessant sind *Wolbachia*-Infektionen auch im Zusammenhang mit interspezifischer Hybridisierung und Introgression von mtDNA. Da auf dem Wege der Hybridisierung zwischen verschiedenen Arten und anschließender Rückkreuzung mit einer der Elternarten Mitochondrien die Artgrenzen überschreiten können, können auf demselben Wege auch assoziierte *Wolbachia*-Infektionen von einer Art auf eine andere überspringen. In der Folge kann, sofern die Infektion sich in der Population verbreitet, auf diesem Wege auch die

assoziierte mitochondrielle DNA in der betreffenden Population effektiv verbreitet werden und die ursprüngliche Form nach und nach ersetzen (Abb. 8; Jiggins 2003).

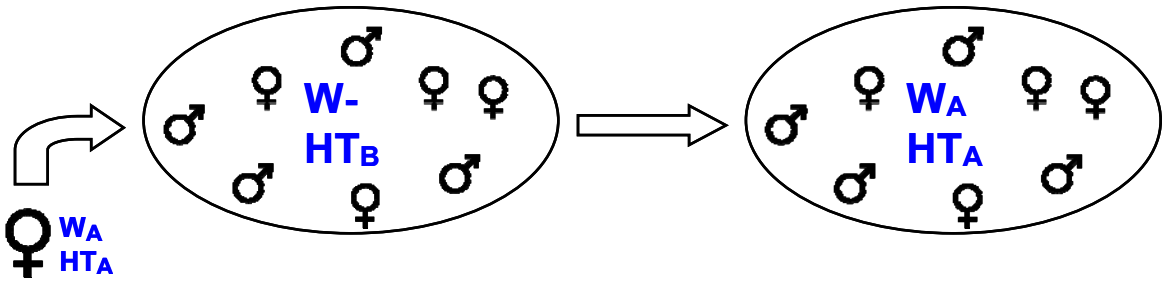

Abb. 8 Schematische Darstellung der Übertragung eines *Wolbachia*-Stammes (W_A) und des mit dieser Infektion assoziierten mtDNA-Haplotyps (HT_A) von einem infizierten weiblichen Tier auf eine nicht infizierte Population der gleichen Art, die den Haplotyp HT_B aufweist. Aufgrund der Kompatibilität zwischen infizierten Weibchen und nicht infizierten Männchen kommt es zu einer Übertragung der Infektion, zur Ausbreitung der Wolbachien in der Population und damit einhergehend zur Ausbreitung des assoziierten mitochondriellen Happlotyps HT_A.

Die Betrachtung der Charakteristika und Effekte dieser Bakterien und die weite Verbreitung dieses Taxons innerhalb der Arthropoda machen deutlich, dass *Wolbachia* in der Evolution einen wichtigen Faktor repräsentiert (Bordenstein et al. 2001, Charlat et al. 2003). Die vorliegende Arbeit befasst sich daher insbesondere mit dem Einfluss dieser "reproduktiven Parasiten" auf die Gattung *Altica*.

1.7. Untersuchungen zur Gattung *Altica* und zum Einfluss von *Wolbachia*

1.7.1. Einfluss von *Wolbachia*-Infektionen auf phylogenetische Muster: Bisherige Ergebnisse

Aufgrund der bereits in zahlreichen Studien nachgewiesenen Möglichkeit einer Einflussnahme eines äußeren Faktors wie *Wolbachia* auf phylogenetische Prozesse eines Wirtstaxons (z.B. Hurst & Jiggins 2005) wurde die Untersuchung der mit *Wolbachia* infizierten Gattung *Altica* im Hinblick auf diese schon in vorangegangenen Untersuchungen überprüft (Diplomarbeit R. Jäckel 2005, Diplomarbeit D. Mora 2006). Diese Thematik betreffend wurde eine phylogenetische Analyse einer Reihe heimischer *Altica*-Arten mittels Sequenzierung eines etwa 1700bp langen Abschnitts der mtDNA (Abschnitte von *COI* und *COII* sowie die dazwischen liegende Sequenz der $tRNA^{leu}$) durchgeführt (Abb. 9). Um einen möglichen Einfluss einer Infektion mit *Wolbachia* auf die Dynamik der mtDNA aufzudecken, wurde die mittels dieser mtDNA-Sequenzdaten rekonstruierte Phylogenie der Käfer mit der Phylogenie der diese Individuen infizierenden *Wolbachia*-Bakterien verglichen. Letztere wurde auf der Grundlage eines etwa 1000bp langen Abschnitts des bakteriellen *ftsZ*-Gens erstellt. Dieses Gen weist eine hohe Variabilität auf, die es zu einem

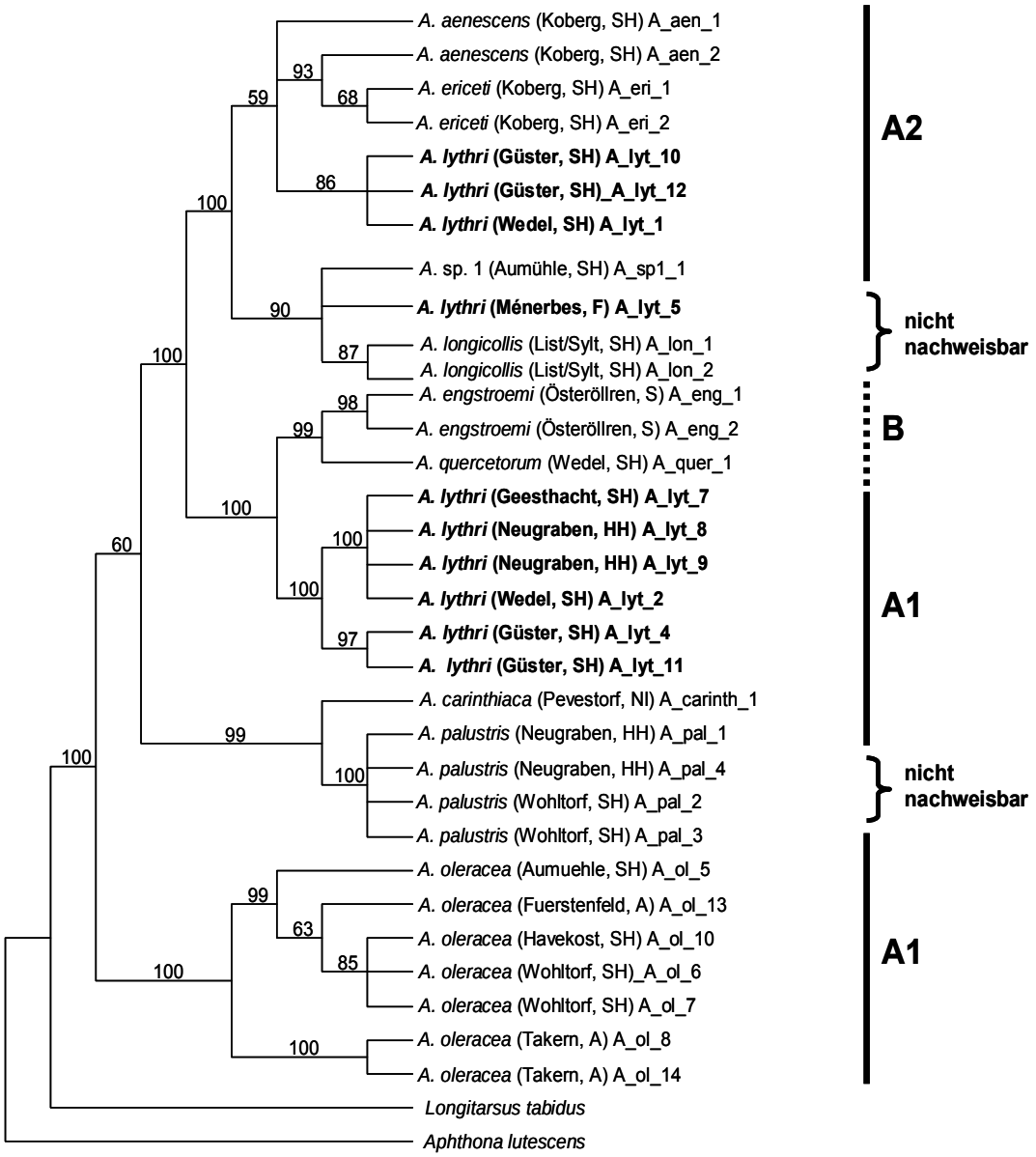

Abb. 9 Strikter MP-Konsensus-Baum (Länge: 864 Schritte; CI = 0,77), erstellt aus 195 kürzesten Bäumen. Die Analyse umfasst 10 Arten beziehungsweise 32 Individuen der Gattung *Altica* sowie *Aphthona lutescens* und *Longitarsus tabidus* als Außengruppe. Die Werte an den Ästen entsprechen Bootstrap-Werten in 500 heuristischen Suchen. Auf der rechten Seite ist der jeweilige Status der *Wolbachia*-Infektion für alle *Altica*-Individuen angegeben (Daten über Infektionstypen: D. Mora, 2006). A1-*Wolbachia*-Stamm A1; A2-*Wolbachia*-Stamm A2; B-*Wolbachia*-Stamm B.

für die Unterscheidung zwischen nah verwandten *Wolbachia*-Stämmen, wie sie bei Untersuchungen auf der Ebene von Gattungen und Arten zu erwarten sind, geeigneten Marker machen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen einige Erkenntnisse zu, warfen jedoch auch eine Reihe weiterer Fragen auf.

Bei fast allen untersuchten *Altica*-Arten und einem Großteil der zur Verfügung stehenden Individuen konnte eine Infektion mit *Wolbachia* der Supergroups A beziehungsweise B

nachgewiesen werden (Abb. 9, Daten von D. Mora, Diplomarbeit 2006). Der Großteil der gefundenen Bakterien gehörte hierbei der Supergroup A an; hierbei ließen sich zwei deutlich verschiedene Stämme unterscheiden, die als A1 und A2 bezeichnet wurden, und bei lediglich drei *Altica*-Arten wurde ein Stamm nachgewiesen, der der Supergroup B zugeordnet werden konnte (Tab. 2). Das auffälligste Ergebnis der phylogenetischen Analyse der mtDNA-Sequenzen der Gattung *Altica* war die polyphyletische Auflösung der Art *A. lythri*. Innerhalb dieser Art fanden sich zwei durch hohe p-Distanzen voneinander getrennte mtDNA-Haplotypen (HT1 und HT2); die Sequenzdivergenzen zwischen diesen Formen lagen bei 4,3%, was die genetischen Unterschiede zu anderen Arten teilweise deutlich übertraf. Bemerkenswerterweise konnten die beiden Haplotypen sogar innerhalb der gleichen Population nachgewiesen werden (zum Beispiel Population Wedel, Abb. 9).

Tab. 2 Nachgewiesene *Wolbachia*-Infektionen (*ftsZ*-Sequenzen) bei den zehn bislang analysierten *Altica*-Arten. Daten ermittelt von D. Mora, 2006.

Art	*Wolbachia*-Stamm
A. aenescens	A2
A. carinthiaca	A1
A. engstroemi	B
A. ericeti	A2
A. longicollis	---
A. lythri	A1, A2
A. oleracea	A1
A. palustris	A1
A. quercetorum	B
A. sp. 1	A2

A. lythri erwies sich zudem als die einzige Art, deren Individuen mit unterschiedlichen *Wolbachia*-Stämmen infiziert waren (A1 und A2; Tab. 2), und auch hier fanden sich unterschiedliche Infektionstypen innerhalb von Populationen. Entsprechend der auf der Assoziation beider Elemente beruhenden Annahme waren die bei *A. lythri* gefundenen mtDNA-Haplotypen HT1 und HT2 zudem konstant mit jeweils einem spezifischen *Wolbachia*-Stamm assoziiert: So trat eine Infektion mit A1 nur bei Tieren des Haplotyps HT1 auf, der Stamm A2 fand sich ausschließlich bei Individuen des Haplotyps HT2.

Die hier dargestellten Ergebnisse vorheriger Untersuchungen führen zu einer wesentlichen Fragestellung: Inwieweit haben die *Wolbachia*-Bakterien die Evolution ihres Wirtes beeinflusst? Insbesondere soll geklärt werden, wie bedeutend der Einfluss der Bakterien auf die Populationsdynamik der mtDNA ist. Die Beantwortung dieser Frage beinhaltet jedoch nicht nur Effekte der Assoziation zwischen mtDNA und *Wolbachia*-Stamm, sondern soll klären, ob die Bakterien bei *Altica* einen Einfluss auf die Reproduktion haben. Von besonderem Interessse ist hier die Beantwortung der Frage, ob Individuen durch cytoplasmatische Inkompatibilität reproduktiv isoliert sind. Auf diese und andere Fragen, auf die in den folgenden Kapiteln eingegangen wird, soll in der vorliegenden Arbeit eine Antwort gefunden werden.

1.7.2. Phylogenie, Populationen, Einfluss von *Wolbachia*: Weiterführende Untersuchungen

1.7.2.1. Analyse der Polyphylie: Mitochondrielle und nukleäre Daten

Die auf der Basis der mitochondriellen DNA polyphyletische Gruppierung der Art *A. lythri* ist eine der augenfälligsten Besonderheiten des untersuchten Systems und die Hypothese zu Hybridisierung und Introgression von mtDNA bedarf weiterer Überprüfung. Da die mittels mitochondrieller Daten rekonstruierte Phylogenie der Gattung *Altica* bisher lediglich einen kleinen Ausschnitt aus einer größeren Anzahl Arten und eine limitierte Anzahl Individuen aus einer geringen Zahl unterschiedlicher Populationen umfasst, war es notwendig, zum einen eine Erweiterung der phylogenetischen Analyse um Sequenzdaten weiterer Arten und weiterer Individuen bereits enthaltener Arten, zum anderen aber auch eine Überprüfung dieser Ergebnisse mittels unabhängiger nukleärer Marker durchzuführen.

Da mtDNA und der jeweils assoziierte *Wolbachia*-Stamm miteinander gekoppelt an die jeweils nächste Generation weitergegeben werden, ist eine auf Daten der mitochondriellen DNA beruhende phylogenetische Analyse zwangsweise vom Einfluss der Bakterien geprägt und lässt keine unabhängige Interpretation der Verwandtschaftsverhältnisse zu. Doch nicht nur *Wolbachia* beeinflusst die Populationsdynamik der mtDNA, auch Hybridisierung und nachfolgende Introgression von mtDNA tragen, neben anderen Faktoren, dazu bei, dass eine allein auf mitochondriellen Daten beruhende Phylogenie nicht unbedingt die tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnisse des untersuchten Taxons widerspiegelt. Andererseits bietet eine solche Analyse aber auch erste Anhaltspunkte für Hinweise auf eine derartige Beeinflussung und auf Introgression, welche dann mittels Analyse nukleärer DNA überprüft werden können.

Einen wesentlichen Bestandteil der erforderlichen Untersuchungen stellte daher die Suche nach der Herkunft der möglicherweise von anderen *Altica*-Arten stammenden und mittels interspezifischer Hybridisierung und Introgression in die Art *A. lythri* gelangten mitochondriellen DNA dar. Auch zu diesem Zweck hatte diese Untersuchung zum Ziel, bislang fehlende Arten in die phylogenetische Untersuchung zu integrieren. Die Erweiterung der phylogenetischen Analyse zielte jedoch auch darauf ab, die Verlässlichkeit der Ergebnisse zu sichern. Insbesondere sollte sichergestellt werden, dass die polyphyletische Auflösung nicht ein allgemeines Problem des untersuchten Systems ist, welches etwa auf fehlerhafter Artbestimmung oder auf Fehlerquellen beruht, die sich aufgrund des verwendeten Markers ergeben, wie Pseudogene oder aber ursprüngliche Polymorphismen (das sogenannte unvollständige "lineage sorting").

Die Erweiterung der Phylogenie umfasst nicht nur die Integration zahlreicher weiterer Sequenzen der mtDNA von zusätzlichen Individuen verschiedener Populationen und weiterer Arten, sondern auch die Überprüfung der auf mitochondrieller DNA beruhenden Phylogenie mittels nukleärer Genabschnitte. Da es sich hier um ein System enger Verwandtschaftsverhältnisse handelt, ist für die Auflösung desselben die Verwendung eines hochgradig variablen Markers notwendig. Die Verwendung von Sequenzen des Introns des Gens EF-1α (Elongationsfaktor-1α) beziehungsweise der rDNA-Spacer ITS1 oder ITS2 (Internal Transcribed Spacer 1 beziehungsweise 2) hat sich zu diesem Zweck bei einer ganzen Reihe verschiedener Forschungsansätze bewährt (Vogler & DeSalle 1994, Miller et al 1996, Fabry et al.1999, Schulenburg et al. 1999, Bargues et al. 2000, Sanchis et al. 2001, Coleman 2007). Während EF-1α an sich ein sehr konserviertes Gen darstellt, evolvieren eingeschlossene Introns schnell und lassen sich für phylogenetische Fragestellungen zu jüngeren Evolutionsereignissen verwenden. Mittels an die konservierten Bereiche der Exons bindenden Primern kann man über Introns hinwegsequenzieren (EPIC: "exon primed intron crossing"; Sanchis et al. 2001) und später Exon- und Intronsequenzen voneinander unterscheiden.

Die ebenfalls hochgradig variablen Marker ITS1 und ITS2 umfassen einen Abschnitt ribosomaler DNA (rDNA), der bei Eukaryoten typischerweise aus hunderten hintereinander liegender Kopien der Transkriptionseinheit besteht, die für die Gene 18S, 5.8S und 28S codiert. Zwischen diesen DNA-Abschnitten liegen die Spacer ITS1 und ITS2 (Abb. 10), die aufgrund ihrer hohen Variabilität häufig für die Rekonstruktion von Phylogenien auf Populations- und Artebene verwendet werden. Beide Marker eignen sich ebenso zur Verwendung bei Hybridisierungsexperimenten sowie zur Detektion kryptischer Arten, Unterarten sowie zur Analyse von Populationsstrukturen (Bargues et al. 2001, Bargues et al. 2003, Mas-Coma et al. 2001). Offenbar koevolvieren ITS1 und ITS2; folglich reicht es aus, nur einen der beiden Spacer zu analysieren (Bargues et al. 2006). Zudem scheinen Befürchtungen, es könne aufgrund des Vorhandenseins mehrerer hundert Kopien der Transkriptionseinheiten Probleme in Bezug auf intragenomische Variabilität kommen, offenbar als unbegründet, da die Repeats einer konzertierten Evolution unterliegen, was dazu führt, dass die ITS-Kopien eines Organismus untereinander identisch sind (Elder & Turner 1995, Alvarez & Wendel 2003, Ganley & Kobayashi 2007).

Abb. 10 Lage der transkribierten Spacer-Regionen ITS1 und ITS2 in der ribosomalen DNA zwischen den codierenden Genabschnitten 18S, 5.8S und 28S.

ITS2-Sequenzen weisen normalerweise Längen zwischen 400 und 600 Basenpaaren auf (e.g. Fritz et al. 1994), können aber auch deutlich länger sein sowie eine interspezifische Längenvariabilität aufweisen (Harris & Drandall 2000). Sie bestehen aus unterschiedlich gestalteten Bereichen, die durch Rückfaltung aufeinander Sekundärstrukturen mit „stems“ und „loops“ ausbilden, deren spezifische Formen ihrerseits für phylogenetische Untersuchungen herangezogen werden können (Abb. 11).

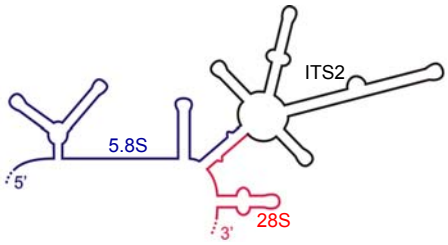

Abb. 11 Sekundärstruktur des *internal* transcribed spacer ITS2 inklusive der angeschlossenen Abschnitte der codierenden rRNA-Gene 28S beziehungswesie 5.8S. Abb. leicht verändert nach http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/images/its2_58_28.jpg

Zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung *Altica* wurden in der vorliegenden Untersuchung sowohl Sequenzen des EF-1α-Introns als auch ITS2-Sequenzen derselben Individuen für die Berechnung der phylogenetischen Beziehungen verwendet, anhand derer die mitochondrielle Phylogenie rekonstruiert wurde.

1.7.2.2. Phylogenetische Analyse des Taxons *Wolbachia*

In unmittelbarem Zusammenhang mit der Analyse der mitochondriellen DNA der Gattung *Altica* steht die Erweiterung des von D. Mora (Diplomarbeit 2006) erhobenen Datensatzes zur phylogenetischen Analyse der in der Gattung *Altica* gefundenen *Wolbachia*-Bakterien. Diese Analyse wurde unter Einbeziehung weiterer Individuen (in Übereinstimmung mit dem mtDNA-Datensatz) unter Verwendung der Sequenzen des bakteriellen *ftsZ*-Gens durchgeführt. Das *ftsZ*-Gen bietet für diese Analysen den Vorteil einer hohen Variabilität bei geringer bis fehlender Rekombinationsrate. Im Gegensatz zum ebenfalls sehr variablen, jedoch stärker der Rekombination unterliegenden Gen *wsp* ist *ftsZ* für phylogenetische Analysen sowie für den Nachweis und die Identifikation von *Wolbachia* gut geeignet (Werren et al. 1995b). Im relativ neu entwickelten ‘Multilocus sequence typing system’ (MLST) werden *ftsZ*-Sequenzen zusammen mit Sequenzen der bakteriellen Gene *gatB*, *coxA*, *hcpA* und *fbpA* verwendet, um *Wolbachia*-Stämme und ihre zahlreichen Allele zu definieren (Baldo et al. 2006b; http://pubmlst.org/*Wolbachia*).

Der Vergleich der aus dem *Altica*- und dem *Wolbachia*-Datensatz rekonstruierten Phylogenien ermöglichte es, den Hinweisen auf eine Beeinflussung der Dynamik der mtDNA durch *Wolbachia* nachzugehen. Hier werden insbesondere "selective sweeps" erkennbar sowie der Zusammenhang zwischen Introgression von mtDNA und

nachfolgender Ausbreitung eines bestimmten *Wolbachia*-Stammes in einer neu infizierten Wirtsart. Gleichzeitig konnte die Diversität der Bakterien differenzierter aufgeklärt werden. Unter Einbeziehung weiterer *ftsZ*-Daten aus unterschiedlichen Datenbanken wurde außerdem eine genaue Zuordnung der bei *Altica* vorkommenden *Wolbachia*-Stämme zu Stämmen und Varianten, die von anderen Wirten des Taxons Arthropoda bekannt sind, vorgenommen. Im Zusammenhang hiermit war es möglich, zu klären, wie stabil die Assoziation zwischen *Altica* und *Wolbachia* ist und inwieweit sich Cospeziation zwischen Wirt und Parasit nachweisen lässt.

1.7.2.3. Geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung von *Altica lythri*

Als besonderer Vorteil erweist es sich, dass *A. lythri* in Deutschland eine der häufigsten und am weitesten verbreiteten Arten ist, die zudem teilweise, vor allem im Frühling, umfangreiche Aggregationen bildet; daher kann die Art leicht in größeren Individuenzahlen gesammelt werden, und umfangreiche Analysen mit großen Stichproben sind problemlos durchzuführen.

Wie erwähnt, konnte bisher gezeigt werden, dass *A. lythri* zwei durch eine hohe Sequenzdivergenz von etwa 4,3% unterscheidbare mitochondrielle Haplotypen aufweist. Darüber hinaus lagen aus den bisherigen phylogenetischen Untersuchungen Hinweise darauf vor, dass Individuen mit diesen unterschiedlichen Haplotypen in Populationen der Art nebeneinander vorkommen (so fanden sich in den Populationen aus Güster und Wedel beide Haplotypen nebeneinander, Abb. 9). Bisher existierten jedoch relativ wenige Daten sowohl über die Verteilung der Haplotypen innerhalb von Populationen als auch über das Vorkommen der einzelnen Formen (oder auch weiterer, bisher unentdeckter Varianten) auf einer größeren geographischen Skala. Daher wurden umfassende Untersuchungen zum generellen Vorkommen der einzelnen Haplotypen, zu ihrer Koexistenz und zu ihrer Häufigkeit durchgeführt. Dies ermöglichte zudem noch eine umfangreiche Analyse der Geschlechterverteilung in den untersuchten Populationen. Die RFLP (restriction fragment length polymorphism)-Methode zum Nachweis von Polymorphismen im Bereich der Schnittsequenz von Restriktionsenzymen ermöglicht eine schnelle Analyse einzelner mtDNA-Haplotypen (Dobler & Farrell 1999). Diese Methode wurde hier bei der deutschlandweiten geographischen Analyse der Haplotypenverteilung bei *A. lythri* angewandt. Dank der bereits erfolgten Sequenzierung der einzelnen mtDNA-Varianten (vergleiche Abschnitt 1.7.2.1) konnte dann jedes Enzymschnittmuster einem der bekannten Haplotypen direkt zugeordnet werden. Außerdem bot sich hier die Möglichkeit, über die

RFLP-Schnittmuster gegebenenfalls schnell neue mtDNA-Varianten ausfindig zu machen, die dann sequenziert und in die phylogenetische Untersuchung eingeschlossen werden konnten.

1.7.2.4. Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität bei *Altica lythri*

Der Nachweis von unterschiedlichen *Wolbachia*-Stämmen innerhalb von Populationen der Art *A. lythri* (Abb. 9, Tab. 2) wirft die Frage auf, ob zwischen Individuen unterschiedlicher Infektionstypen cytoplasmatische Inkompatibilität auftritt. Wäre dies der Fall, wäre dies ein Fall von reproduktiver Isolation zwischen Individuen derselben Art beziehungsweise zwischen Individuen derselben Population. Ein derartiger Befund hätte im Hinblick auf die Möglichkeit einer Einflussnahme von *Wolbachia* auf Speziationsereignisse eine große Bedeutung.

Die experimentelle Überprüfung, ob ein derartiger Isolationsmechanismus innerhalb der Art *A. lythri* vorliegt, erfolgte über die Aufzucht virgineller Tiere mit bekanntem Haplotyp und bekanntem Infektionsstatus unter Durchführung gezielter Verpaarungen. Diese Verpaarungen fanden zwischen Individuen unterschiedlicher und gleicher Infektionstypen statt, um mehrere Varianten von Kompatibilität und Inkompatibilität auf ihr Auftreten testen zu können. Im Falle reduzierter Schlupfraten bei potenziell inkompatiblen Verpaarungen im Vergleich zu potenziell kompatiblen Verpaarungen sollten auf Reproduktionshindernisse beziehungsweise Isolationsmechanismen hinweisen, die möglicherweise auf den Einfluss der Infektion mit unterschiedlichen *Wolbachia*-Stämmen zurückgeführt werden können.

1.7.2.5. Karyologische Untersuchungen zu Polyploidie

Abgesehen von der Möglichkeit, dass die Infektion mit *Wolbachia* bei *Altica* die Ursache für die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zu von Weibchen dominierten Populationen ist, müssen alternative Erklärungsansätze in Erwägung gezogen werden. Die Seltenheit von Männchen ließe möglicherweise auf parthenogenetische Fortpflanzung schließen, doch wurde für heimische Arten diesbezüglich bisher kein Nachweis erbracht.

Thelytok-parthenogenetische Fortpflanzung ist oft gekoppelt mit Polyploidie (Lachowska et al. 2008), und auch die sich parthenogenetisch fortpflanzende Art *A. lazulina* weist einen triploiden Chromosomensatz auf (Smith 1960). Untersuchungen zu Chromosomenzahlen männlicher Exemplare der Art *A. lythri* deuten bislang auf einen diploiden

Chromosomensatz der Art hin; die Chromosomenzahlen werden mit 11^{II}+X+y angegeben (Segarra & Petitpierre 1982).

Da ein vervielfältigter Chromosomensatz als Hinweis auf diesen Weg der Fortpflanzung betrachtet werden kann, sollte für *Altica* über eine karyologisch-mikroskopische Untersuchung des Chromosomensatzes bei Männchen und Weibchen verschiedener Arten nach Hinweisen auf Polyploidie gesucht werden. Wichtig war diese Untersuchung insbesondere deshalb, da bereits Hinweise auf polyploide Chromosomensätze bei einigen, aber nicht allen Individuen der Art *A. oleracea* vorliegen (L. Strüven, Bachelorarbeit 2008).

2. Material und Methoden

2.1. *Altica* und *Wolbachia*: Phylogenetische Untersuchungen

2.1.1. Vorbereitung der Proben

Für die Erweiterung und Vervollständigung der phylogenetischen Untersuchung der Gattung *Altica* wurden weitere heimische und nicht heimische *Altica*-Arten sowie zusätzliche Individuen bereits analysierter Arten gesammelt beziehungsweise es wurde auf gefrorene oder in Ethanol konservierte Exemplare zurückgegriffen (Tab. 3). Wurden an einem Fundort keine oder keine ausreichenden Anzahlen Imagines gefunden, wurden Larven unterschiedlicher Altersstadien gesammelt, im Labor aufgezogen und die geschlüpften Käfer für die Untersuchungen verwendet. Wann immer möglich, wurden von jeder Art beziehungsweise Population mehrere Individuen analysiert. Als Außengruppe für die Rekonstruktion der Phylogenie der Gattung *Altica* wurden zwei Vertreter der mit *Altica* nahe verwandten Gattungen *Hermaeophaga* (*H. mercurialis*) und *Podagrica* (*P. fuscipes*) gewählt. Das für die DNA-Extraktion vorgesehene Gewebe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Jede Imago wurde einer Präparation unterzogen. Nur das Abdomen wurde für die Isolierung der DNA zurückbehalten und die Genitalien der Käfer sowie der Rest des Körpers für die Artbestimmung herangezogen. Für jedes Individuum wurden sowohl der Aedeagus der Männchen beziehungsweise Spermathek, Styli sowie Spiculum ventrale der Weibchen als auch der nach Abtrennung des Abdomens verbleibende Rest des Käfers für spätere Überprüfungen in einer Sammlung hinterlegt. Jedes Individuum wurde in erster Linie anhand der Genitalmorphologie, zusätzlich jedoch auch anhand äußerer Merkmale bestimmt. Hier sind insbesondere Ausprägung und Form von Stirnhöckern und Stirnkiel zu nennen. Zusätzlich bot, sofern bekannt, die Fraßpflanze wichtige Hinweise auf die Artzugehörigkeit. Zur Artbestimmung wurden ausschließlich solche Bestimmungsschlüssel verwendet, die unter besonderer oder zusätzlicher Berücksichtigung der weiblichen Genitalmerkmale erstellt wurden (Kangas & Rutanen 1992, Doguet 1994, Siede 1998). Da häufig angeführt wird, dass die Artbestimmung bei *Altica* schwierig sei und nur anhand der Genitalmorphologie der Männchen überhaupt möglich, wurde besonderes Augenmerk auf die Verwendung männlicher Käfer gelegt, und wo möglich, wurden zusätzlich zu den Weibchen auch immer die zugehörigen Männchen präpariert und analysiert.

Tab. 3 Liste der für die phylogenetischen Analysen bearbeiteten Arten und Individuen der Gattung *Altica*. Individuen, um die die bestehende mtDNA-Phylogenie erweitert wurde, sind in Fettdruck hervorgehoben. Grau hinterlegt: *ftsZ*-Sequenzdaten für *Wolbachia* erhoben von D. Mora, 2006. Spalte 1: Art. Spalte 2: individueller Code zur Identifizierung jedes Individuums. Spalte 3: DNA-Extraktionsmethode. Spalte 4: Fundort; angegeben ist jeweils die nächste Stadt oder der nächstgelegene Ort. Fundorte innerhalb Deutschlands: BW-Baden-Württemberg, HH-Hamburg, NI-Niedersachsen, SH-Schleswig-Holstein, ST-Sachsen-Anhalt, TH-Thüringen. Fundorte außerhalb Deutschlands: A-Österreich, CH-Schweiz, DK-Dänemark, E-Spanien, F-Frankreich, PL-Polen, S-Schweden. Spalte 5: Funddatum. Spalte 6: Pflanzenart, auf der das jeweilige Individuum gefunden wurde. *Pflanze nicht bekannt (entweder keine Angabe oder Kescherfang aus Vegetation); ** Beifang aus Getreidefeldern. † Tier war in Alkohol konserviert.

Art	Code	Extr.	Herkunft	Datum	Pflanze
A. aenescens	A aen 1	Kit	Koberg, SH	27.V.05	*Betula* sp.
	A aen 2	Kit	Koberg, SH	27.V.05	*Betula* sp.
	A aen 3	Kit	Koberg, SH	27.V.05	*Betula* sp.
A. ampelophaga	**A amp 1** †	Kit	Sóller, Mallorca, E	18.IX.06	*Vitis vinifera*
	A amp 2 †	Kit	Sóller, Mallorca, E	18.IX.06	*Vitis vinifera*
	A amp 3 †	Kit	Sóller, Mallorca, E	18.IX.06	*Vitis vinifera*
A. birmanensis	**A bir 1**	Kit	Fushan, Taiwan	12.II.01	--- *
A. brevicollis	**A brev 1**	Kit	Griesheim, BW	20.VI.96	--- *
A. carinata	**A carina 1**	Kit	Taos, USA	ohne Angabe	Onagraceae Gen. sp.
	A carina 2	Kit	Taos, USA	ohne Angabe	Onagraceae Gen. sp.
A. carinthiaca	A carinth 1	Kit	Pevestorf, NI	12.V.05	--- *
	A carinth 2	Kit	Pevestorf, NI	01.IX.06	--- *
A. engstroemi	A eng 1	Kit	Österöllren, S	04	*Filipendula ulmaria*
	A eng 2	Kit	Österöllren, S	04	*Filipendula ulmaria*
A. ericeti	A eri 1	Kit	Koberg, SH	17.VI.05	*Erica tetralix*
	A eri 2	Kit	Koberg, SH	17.VI.05	*Erica tetralix*
A. helianthemi	**A hel 1**	Kit	Badberg, BW	02.V.00	--- *
	A hel 2	Chelex	Freiburg, BW	02.V.08	--- *
	A hel 3	Chelex	Freiburg, BW	02.V.08	--- *
A. impressicollis	**A imp 1**	Kit	Altenteil, SH	12.VIII.07	*Epilobium hirsutum*
A. longicollis	A lon 1	Kit	List, SH	28.V.05	*Empetrum nigrum*
	A lon 2	Kit	List, SH	28.V.05	*Empetrum nigrum*
A. lythri	A lyt 1	Kit	Wedel, SH	03.V.05	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 2	Kit	Wedel, SH	03.V.05	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 3	Kit	Wedel, SH	03.V.05	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 4	Kit	Güster, SH	21.VI.05	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 5	Kit	Ménerbes, F	18.V.05	--- *
	A lyt 6	Kit	Geesthacht, SH	VI.05	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 7	Kit	Geesthacht, SH	VI.05	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 8	Kit	Neugraben, HH	10.VI.05	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 9	Kit	Neugraben, HH	10.VI.05	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 10	Kit	Güster, SH	21.VI.05	*Oenothera* sp.
	A lyt 11	Kit	Güster, SH	21.VI.05	*Oenothera* sp.
	A lyt 12	Kit	Güster, SH	21.VI.05	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 13	Kit	Geesthacht, SH	16.VI.05	*Oenothera* sp.
	A lyt 14	Kit	Freiburg, BW	VII.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 15	Kit	Freiburg, BW	VII.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 16	Kit	Seedorf, SH	28.VIII.05	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 17	Kit	Seedorf, SH	28.VIII.05	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 18	Kit	Mölln, SH	18.VI.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 19	Kit	Pevestorf, NI	04.IX.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 20	Kit	Büchen, SH	28.IV.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 21	Kit	Ilmenau, TH	27.IX.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 22	Kit	Freiburg, BW	VII.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 23	Kit	Freiburg, BW	VII.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 24	Kit	Ilmenau, TH	27.IX.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 25	Kit	Ilmenau, TH	27.IX.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 26	Kit	Ilmenau, TH	27.IX.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 27	Kit	Ilmenau, TH	27.IX.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 28	Kit	Altenteil, SH	14.VII.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 29	Chelex	Wedel, SH	02.V.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 30	Chelex	Wedel, SH	02.V.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 31	Chelex	Wedel, SH	IV.06	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 32	Chelex	Altenteil, SH	09.VII.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 33	Kit	Escheburg, SH	01.VII.07	*Epilobium* sp.
	A lyt 34	Chelex	Bretten, BW	13.VI.07	*Epilobium* sp.
	A lyt 35	Kit	Escheburg, SH	01.VII.07	*Epilobium* sp.

Tab. 3 Liste der für die phylogenetische Analyse bearbeiteten Individuen der Gattung *Altica* (Fortsetzung).

Art	Code	Extr.	Herkunft	Datum	Pflanze
	A lyt 36	Kit	Escheburg, SH	08.VI.08	*Epilobium* sp.
	A lyt 37	Chelex	Bretten, BW	18.VI.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 38	Chelex	Hahndorf, NI	15.VIII.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 39	Chelex	Hahndorf, NI	15.VIII.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 40	Kit	Escheburg, SH	01.VII.07	*Epilobium* sp.
	A lyt 41	Chelex	Bretten, BW	16.VI.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 42	Kit	Escheburg, SH	08.VI.08	*Epilobium* sp.
	A lyt 43	Chelex	Karlsruhe, BW	15.VI.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 44	Chelex	Karlsruhe, BW	15.VI.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 45	Chelex	Karlsruhe, BW	15.VI.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 46	Kit	Komorze, PL	22.VIII.08	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 47	Kit	Komorze, PL	22.VIII.08	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 48	Chelex	Treia, SH	14.IV.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 49	Chelex	Treia, SH	14.IV.07	*Epilobium hirsutum*
	A lyt 50	Chelex	Treia, SH	14.IV.07	*Epilobium hirsutum*
A. oleracea	**A ol 1**	Kit	Wedel, SH	18.V.04	--- *
	A ol 2	Kit	Wedel, SH	18.V.04	--- *
	A ol 3	Kit	Hamfelde, SH	27.V.05	*Epilobium* sp.
	A ol 4	Kit	Aumühle, SH	22.V.05	--- *
	A ol 5	Kit	Aumühle, SH	12.VI.05	*Epilobium angustifolium*
	A ol 6	Kit	Wohltorf, SH	14.VI.05	*Epilobium* sp.
	A ol 7	Kit	Wohltorf, SH	31.III.05	--- *
	A ol 8	Kit	Takern, A	23.IV.05	Weizen **
	A ol 9	Kit	Havekost, SH	18.VIII.05	*Corylus avellana*
	A ol 10	Kit	Havekost, SH	18.VIII.05	*Corylus avellana*
	A ol 11	Kit	Hamfelde, SH	27.V.05	*Epilobium* sp.
	A ol 12	Kit	Fürstenfeld, A	24.IV.05	Gerste **
	A ol 13	Kit	Fürstenfeld, A	24.IV.05	Gerste **
	A ol 14	Kit	Takern, A	23.IV.05	Dinkel **
	A ol 15	Kit	Brunstorf, SH	15.IV.05	--- *
	A ol 16	Kit	Pevestorf, NI	02.IX.06	*Oenothera* sp.
	A ol 17	Kit	Pevestorf, NI	02.IX.06	*Oenothera* sp.
	A ol 18	Kit	Lund, S	27.IX.06	*Epilobium hirsutum*
	A ol 19	Kit	Helnæs, DK	VIII.06	--- *
	A ol 20 †	Kit	Burgwenden, TH	03.VII.06	--- *
	A ol 21 †	Kit	Himmelsberga, S	11.VI.06	*Helianthemum nummularium*
	A ol 22	Chelex	Waghäusel, BW	14.VI.07	*Oenothera* sp.
	A ol 23	Chelex	Quickborn, SH	20.V.08	*Epilobium angustifolium*
	A ol 24	Chelex	Barendorf, NI	09.IX.07	*Epilobium hirsutum*
A. palustris	A pal 1	Kit	Neugraben, HH	10.VI.05	*Epilobium* sp.
	A pal 2	Kit	Wohltorf, SH	13.VIII.05	*Epilobium*
	A pal 3	Kit	Wohltorf, SH	13.VIII.05	*Epilobium*
	A pal 4	Kit	Neugraben, HH	10.VI.05	*Epilobium* sp.
	A pal 5	Kit	Griesheim, BW	20.VI.96	--- *
	A pal 6	Kit	Pevestorf, NI	05.IX.06	*Lythrum salicaria*
	A pal 7	Kit	Escheburg, SH	01.VII.07	*Epilobium* sp
	A pal 8	Chelex	Schelingen, BW	02.V.08	--- *
	A pal 9	Chelex	Treia, SH	14.IV.07	*Epilobium hirsutum*
A. quercetorum	A quer 1	Kit	Wedel, SH	03.IX.04	*Quercus robur*
	A quer 2 †	Kit	Berkau, ST	25.II.2009	--- *
A. sp. 1	A sp1 1	Kit	Aumühle, SH	12.VI.05	*Epilobium angustifolium*
	A sp1 2	Kit	Aumühle, SH	12.VI.05	*Epilobium angustifolium*
	A sp1 3	Kit	Aumühle, SH	13.VIII.06	*Epilobium angustifolium*
	A sp1 4	Kit	Aumühle, SH	13.VIII.06	*Epilobium angustifolium*
A. sp. 2	**A sp2 1**	Kit	Bos-Cha, CH	IX..96	--- *
	A sp2 2	Kit	Bos-Cha, CH	IX..96	--- *
A. tamaricis	**A tam 1**	Kit	Les Vans, F	22.VI.97	*Salix* sp.
	A tam 2	Kit	Les Vans, F	22.VI.97	*Salix* sp.

2.1.2. DNA-Extraktion und Amplifizierung

Für jede DNA-Probe (jeweils ein Individuum) wurde die DNA aus dem Abdomen isoliert. Hierzu wurde das Gewebe in 1,5ml-Reagiergefäßen (Firma Sarstedt, Nümbrecht) mit Hilfe eines Homogenisators unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und zur anschließenden Extraktion entweder das DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach den Vorgaben des Herstellers oder eine 10%ige Chelex-Suspension (in 1XTE-Puffer, pH 8,0; autoklaviert) verwendet (Walsh et al. 1991). Zur genauen Durchführung der Extraktion mittels Chelex siehe Abschnitt 2.2. Die isolierte Gesamt-DNA wurde für die Dauer der Untersuchungen in Puffer (entweder in Elutionspuffer des Herstellers Qiagen oder im TE-Puffer der Chelex-Suspension) bei +4°C aufbewahrt.

Ein etwa 1740bp langes Fragment der mtDNA, bestehend aus einem Teil des *COI*-Gens, der Sequenz der zwischenliegenden $tRNA^{leu}$ sowie eines Teils des *COII*-Gens wurde mit Hilfe der drei Primerpaare S1634/A2188 (ca 550bp), S2095/A3020 (ca 920bp) und S2798/A3380 (ca 580bp) (Tab. 4) in 25µl-Ansätzen amplifiziert. Folgendes Programm führte zu optimalen Ergebnissen: Initiale Denaturierung bei 95°C für 2 Minuten; 35 Zyklen bei 95°C für 45 Sekunden, 48°C (Annealing-Temperatur) für 1 Minute, 72°C für 1 Minute, gefolgt von einem finalen Elongationsschritt bei 72°C für 5 Minuten.

Die zwecks Überprüfung der auf mitochondriellen Daten beruhenden phylogenetischen Analyse eingesetzten nukleären Sequenzdaten der entsprechenden *Altica*-Individuen wurden mit den Primerkombinationen EF-INS und EF-INA für das EF1α-Intron beziehungsweise ITS3f und ITS4r für ITS2 (Gómez-Zurita et al. 2000) durchgeführt (Tab. 4). Für die Amplifizierung des DNA-Abschnittes wurde folgendes PCR-Programm mit Annealing-Temperaturen (T_A) zwischen 28 und 54°C, abhängig von der jeweiligen Probe, verwendet: Initiale Denaturierung bei 95°C für 2 Minuten; 35 Zyklen bei 95°C für 45 Sekunden, T_A für 1 Minute, 72°C für 1 Minute, gefolgt von einem finalen Elongationsschritt bei 72°C für 5 Minuten.

Der Nachweis einer Infektion mit *Wolbachia*-Bakterien sowie die Bestimmung des Infektionstyps (das heißt, des *Wolbachia*-Stammes) unter Verwendung des bakteriellen *ftsZ*-Gens erfolgten wiederum bei denselben Individuen. Es wurde die Primerkombination ftsZf1/ftsZr1 verwendet (Werren et al. 1995b; Tab. 4); das resultierende DNA-Fragment umfasste etwa 1100 Basenpaare. Die PCR-Reaktionen wurden mit folgendem Programm durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten; 35 Zyklen bei 95°C für 45 Sekunden, 45°C für 1 Minute, 72°C für 1 Minute, gefolgt von einem finalen Elongationsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

Alle Primer waren mit einem der Komplementärsequenz der infrarotmarkierten Sequenzierungsprimer M13 und M13rev (Tab. 4) entsprechenden sogenannten "Tail" ausgestattet. Dies bedeutet, dass die Nucleotidabfolgen der Sequenzierungsprimer am 5'-Ende der PCR-Primer angehängt sind und während der Amplifizierungsreaktion in das PCR-Produkt inkorporiert werden. Jedes auf diese Weise erhaltene PCR-Produkt kann anschließend mit den infrarotmarkierten Sequenzierungsprimern sequenziert werden.

Die PCR-Produkte wurden auf Agarose-Gelen (1% Agarose in 1XTAE-Puffer) mittels Ethidiumbromid-Färbung über UV-Licht sichtbar gemacht und bei erfolgreicher Amplifikation unter Verwendung des PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) den Anweisungen des Herstellers folgend gereinigt; die Eluate (in H_2O) wurden bei -20°C gelagert. Im Falle "unsauberer" Banden oder Doppelbanden wurden die DNA-Abschnitte gewünschter Länge mit Hilfe des Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus einem 2%igen präparativen Agarose-Gel herausgelöst, nach Vorgabe des Herstellers gereinigt und die DNA mit H_2O eluiert. Dies betrifft insbesondere Amplifikationen des Markers ITS2, da hier häufiger eine zusätzliche DNA-Bande auftrat (Abschnitt 3.1.2.2).

Tab. 4 Auflistung der in den phylogenetischen Analysen verwendeter Primer; jeweils mit M13-Tail am 5'-Ende (nicht gezeigt). Die Primer mit der Bezeichnung M13 beziehungsweise M13rev wurden für sämtliche Sequenzierungsarbeiten fluoreszenzmarkiert verwendet (700nm bzw. 800nm).

Primer	Sequenz
S1634	5' - ATTGGAGATGAYCAAATTTATAAYGT - 3'
A2188	5' - CCWGGTAGAATTARAATRTADACTTCWGG - 3'
S2095	5' - GCGCGCGCGCGGDGCWATYACHATAYT - 3'
A3020	5' - GGAGCTTAAATCCAATACACTATTCTGCC - 3'
S2798	5' - GGWATACCWCGACGTTATTCTGAYTATCC - 3'
A3380	5' - GATCARTATCATTGATGDCCAAT - 3'
EF-INS	5' - CCNACNGARAARCCCCTNCGTCTTCC-3'
EF-INA	5' - GGTACTGTTCCRATACCWCCAATYTTGT-3'
ITS3 f	5' - GCATCGATGAAGAACGCAGC - 3'
ITS4 r	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'
ftsZf1	5' - GTTGTCGCAAATACCGATGC - 3'
ftsZr1	5' - CTTAAGTAAGCTGGTATATC - 3'
M13	5' - TGTAAAACGACGGCCAGT - 3'
M13rev	5' - CAGGAAACAGCTATGACC - 3'

2.1.3. Sequenzierung

Bidirektionale Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger 1977) durchgeführt. Der Großteil der Proben wurde unter Verwendung des Thermosequenase Sequencing Kits (Amersham, Braunschweig) auf einem automatischen Sequenzierer (Li-Cor 4200L, MWG Biotech, Ebersberg) sequenziert (Länge der Polyacrylamidgele: 66cm). Folgendes Sequenzierungsprogramm wurde verwendet: Initiale Denaturierung bei 95°C für 2 Minuten; 20 Zyklen bei 95°C für 30 Sekunden, 56°C für 20 Sekunden und 65°C für 2 Minuten. Jeder Reaktionsansatz wurde mit 3 µl Li-Cor IR^2 Stop-Lösung versetzt, für 3 Minuten bei 95°C denaturiert und unmittelbar auf Eis heruntergekühlt. Von jeder Probe

wurden 0,5 bis 1 µl auf das Sequenzierungsgel geladen. Das Einlesen der Sequenzen erfolgte über das Programm e-seq (Li-Cor, MWG Biotech). Einige wenige Proben wurden unter Verwendung eines Kapillarsequenzierers (ABI 3100, Applied Biosystems, Darmstadt) sequenziert. In diesen Fällen wurde folgendes Sequenzierungsprogramm verwendet: Initiale Denaturierung bei 96°C für 60 Sekunden; 30 Zyklen bei 96°C für 30 Sekunden, 56°C für 15 Sekunden und 60°C für 4 Minuten. Die Sequenzierungen erfolgten bidirektional mit den mit unterschiedlichen Infrarot-Farbstoffen markierten Sequenzierungsprimer (M13-IR800 und M13rev-IR700, Tab. 4).

2.1.4. Phylogenetische Analyse

Unter Verwendung des BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) wurden sämtliche Sequenzen abgeglichen und verifiziert, danach mittels des Programms Sequencher 4.6 (Gene Codes Corporation) editiert und aligniert; für den mitochondriellen Datensatz erfolgte das Zusammenfügen der abschnittweise sequenzierten DNA ebenfalls mit diesem Programm. Die Alignierung der ITS2-Sequenzen erfolgte mittels ClustalX (Thompson et al. 1997) unter Verwendung der Voreinstellungen.

Zur Analyse des Verwandtschaftsverhältnisses zwischen den bei *Altica* gefundenen *Wolbachia*-Stämmen wurden zwecks Etablierung einer Außengruppe zusätzlich die *ftsZ*-Sequenzen der Supergroups E (von *Folsomia candida*, Collembola; Acc.No. AJ344216) und F (von *Kalotermes flavicollis*, Isoptera; Acc.No. AJ292345) aus der NCBI-Datenbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) bezogen. Um den von *Altica* erhaltenen *ftsZ*-Datensatz im Hinblick auf Cospeziation zwischen *Altica* und *Wolbachia* untersuchen zu können, wurde dieser zudem um eine große Vielfalt von *ftsZ*-Sequenzen erweitert; hierzu wurden Sequenzen sowohl von der MLST (http://pubmlst.org; 47 Allele) als auch von der NCBI-Datenbank (22 Sequenzen) bezogen und zusammen mit den von *Altica* erhaltenen Daten ausgewertet (Tab. 5).

Da sich die Sequenzen des EF1α-Introns als weitgehend invariabel herausstellten, wurden die Anstrengungen zur Analyse dieses Markers sehr bald eingestellt, und eine phylogenetische Auswertung fand wegen der fehlenden Aussagekraft nicht statt.

Das Programm Modeltest (Posada & Crandall 1998) wurde zur Berechnung von Likelihood-Scores für 56 Substitutionsmodelle unter PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) für die für *COI/II*, ITS2 und *ftsZ* erhaltenen Datensätze verwendet. Die Auswahl der optimalen

Tab. 5 Auflistung der aus der MLST-beziehungsweise NCBI-Datenbank bezogenen *ftsZ*-Sequenzen. Die Bezeichnungen für die Allele (MLST) bzw. die Zugriffscodes sowie das jeweilige Wirtstaxon (NCBI) sind angegeben. Wenn ein und dasselbe Allel in mehreren unterschiedlichen Wirten gefunden wurde, sind lediglich Familie und die Ordnung des Wirtes aufgeführt.

MLST-Datenbank	
Allel	**Wirt**
ftsZ 1	*Drosophila melanogaster* (Diptera)
ftsZ 2	Lycaenidae, Nymphalidae (Lepidoptera)
ftsZ 3	Hymenoptera (z.B. *Nasonia* spp.; Formicidae), Lepidoptera (z.B. Lycaenidae), *Drosophila* spp. (Diptera)
ftsZ 4	*Drosophila simulans* (Diptera)
ftsZ 5	*Pheidole qatesi* (Hymenoptera, Formicidae)
ftsZ 6	*Hymenoptera (z.B. Nasonia vitripennis;* Formicidae)
ftsZ 7	*Lycaeides idas* (Lepidoptera), *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera)
ftsZ 9	*Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda)
ftsZ 10	*Aedes albopictus* (Diptera)
ftsZ 11	*Acraea encedon* (Lepidoptera)
ftsZ 12	*Chelymorpha alternans* (Coleoptera)
ftsZ 13	*Drosophila bifasciata* (Diptera)
ftsZ 14	*Drosophila orientacea, D. neotestacea* (Diptera)
ftsZ 15	*Encarsia formosa* (Hymenoptera), *Protocalliphora sialia* (Diptera)
ftsZ 16	*Gryllus firmus* (Orthoptera)
ftsZ 17	Formicidae (Hymenoptera), Isoptera
ftsZ 18	*Tribolium confusum* (Coleoptera)
ftsZ 19	*Trichogramma deion* (Lepidoptera)
ftsZ 20	*Teleogryllus taiwanemma* (Orthoptera)
ftsZ 21	*Acromis sparsa* (Coleoptera)
ftsZ 23	*Ephestia kuehniella* (Lepidoptera)
ftsZ 24	*Cimex lectularius* (Hemiptera)
ftsZ 25	*Camponotus pennsylvanicus* (Formicidae, Hymenoptera)
ftsZ 30	*Agelenopsis aperta* (Araneae)
ftsZ 32	*Ceutorhynchus obstrictus* (Coleoptera, Curculionidae), Hymenoptera (Pompilidae, Formicidae)
ftsZ 33	*Agelenopsis aperta, A. emertoni, A. oklahoma* (Araneae)
ftsZ 34	*Jamides alecto* (Lycaenidae, Lepidoptera)
ftsZ 35	Lycaenidae, Pieridae (Lepidoptera)
ftsZ 36	Lycaenidae, Pieridae (Lepidoptera)
ftsZ 37	*Stenamma snellingi, Myrmica incompleta* (Formicidae, Hymenoptera)
ftsZ 38	*Wasmannia* sp. (Formicidae, Hymenoptera)
ftsZ 39	*Metapone madagascaria* (Formicidae, Hymenoptera)
ftsZ 40	*Polyergus breviceps* (Formicidae, Hymenoptera)
ftsZ 41	*Pheidole sciophila* (Formicidae, Hymenoptera)
ftsZ 42	*Camponotus leonardi* (Formicidae, Hymenoptera)
ftsZ 43	*Pheidole vallicola* (Formicidae, Hymenoptera)
ftsZ 44	*Rhytidoponera metallica* (Formicidae, Hymenoptera)
ftsZ 45	Formicidae (Hymenoptera)
ftsZ 46	*Dorymyrmex elegans* (Formicidae, Hymenoptera)
ftsZ 47	*Agelenopsis utahana* (Araneae)
ftsZ 57	*Zootermes angusticollis* (Isoptera)
ftsZ 64	*Iraota rochana* (Lycaenidae, Lepidoptera)
ftsZ 65	*Brangas felderi* (Lycaenidae, Lepidoptera)
ftsZ 66	*Libythea myrrha* (Nymphalidae, Lepidoptera)
ftsZ 67	*Odontomachus clarus* (Formicidae, Hymenoptera)
ftsZ 68	*Ocymyrmex picardi* (Formicidae, Hymenoptera)
ftsZ 73	*Hypolimnas bolina, Colias elate poliographus* (Lepidoptera)
NCBI-Datenbank	
Acc.-No.	**Wirt**
AB499742	*Orius strigicollis* (Heteroptera)
AJ292345	*Kalotermes flavicollis* (Isoptera)
AJ344216	*Folsomia candida* (Collembola)
AY136550	*Aphthona nigriscutis* (Coleoptera)
AY227737	*Rhagoletis/Drosophila* (Diptera)
EF219196	*Ixodes ricinus* (Acari)
EU126324	*Apoica* sp. (Hymenoptera)
EU126333	*Drosophila innubila* (Diptera)
EU126335	*Suillia* sp. (Diptera)
EU126338	*Drosophila munda* (Diptera)
EU126341	*Hirtodrosophila trilineata* (Dipera)
EU126342	*Drosophila orientacea* (Diptera)
EU126353	*Polistes dominulus* (Hymenoptera)
EU126355	*Polybia* sp. (Hymenoptera)
EU126366	*Leucophenga maculosa* (Diptera)
GQ150289	*Psyttalia lounsburyi* (Hymenoptera)
GQ422850	*Odontotermes horni* (Isoptera)
GU013554	*Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera)
GU013555	*Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera)
GU724214	*Tetrastichus coeruleus* (Hymenoptera)
GU901160	*Culex pipiens* (Diptera)
HM104434	*Cotesia sesamiae* (Hymenoptera)
HM104435	*Cotesia sesamiae* (Hymenoptera)

für

Evolutionsmodelle erfolgte unter Verwendung von Modeltest und des Akaike Information Criterion. Die ausgewählten Modelle waren TVM+I+G für *COI/II*, GTR+G für *ftsZ* beziehungsweise TVM+G für ITS2. Die phylogenetischen Analysen wurden separat für jeden Marker durchgeführt; die Berechnungen erfolgten mit dem Programm MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) unter Verwendung des GTR+G+I-Modells. Die Analysen umfassten jeweils zwei Läufe mit je drei Millionen Generationen (für den erweiterten *ftsZ*-Datensatz und für ITS2) beziehungsweise fünf Millionen Generationen (für den von *Altica* erhaltenen *ftsZ*-Datensatz und für *COI/II*), mit Datenaufnahme in jeder 500 Generation und je vier parallel laufenden *Markov chains* (drei "heated" chains). Jeweils die ersten 25% der generierten Bäume wurden als sogenannter "burn-in" verworfen.

2.2. Geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung bei *Altica lythri*

2.2.1. Vorbereitung der Proben

Für die geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung bei der Art *A. lythri* wurden Individuen aus insgesamt 14 Populationen vom Norden bis in den Süden Deutschlands entnommen (Abb. 12, Tab. 6). Die Populationen "Bad Segeberg" und "Bretten" umfassen hierbei Individuen, die an mehr als zwei Standorten gesammelt wurden (Tab. 7); die Einzelfundorte lagen jedoch nah beieinander und wurden daher zusammengefasst.

Tab. 6 Auflistung der 14 in die geographische Analyse der Haplotypenverteilung der Art *A. lythri* eingegangenen Populationen, sortiert von der nördlichsten (1) zur südlichsten (14) Population, mit Angabe des jeweiligen Bundeslandes sowie der Gesamtzahl der aus jeder Population entnommenen Individuen. *Population unter Zusammenfassung von zwei oder mehr nah beieinander liegenden Fundorten, vgl. Tab. 7.

Nr	Population	Bundesland	Anzahl
1	Altenteil	Schleswig-Holstein (SH)	83
2	Treia	Schleswig-Holstein (SH)	36
3	Tümlauer Koog	Schleswig-Holstein (SH)	89
4	Pratjau	Schleswig-Holstein (SH)	16
5	Bad Segeberg*	Schleswig-Holstein (SH)	36
6	Kollmar	Schleswig-Holstein (SH)	33
7	Wedel	Schleswig-Holstein (SH)	37
8	Büchen	Schleswig-Holstein (SH)	63
9	Barendorf	Niedersachsen (NI)	32
10	Pevestorf	Niedersachsen (NI)	79
11	Hahndorf	Niedersachsen (NI)	61
12	Ilmenau	Thüringen (TH)	11
13	Bretten*	Baden-Württemberg (BW)	89
14	Freiburg	Baden-Württemberg (BW)	33

Bei der Suche nach Populationen wurde gezielt nach Standorten der Fraßpflanze, *Epilobium hirsutum*, gesucht. Standen keine ausreichenden Anzahlen Imagines zur Verfügung, wurden Larven oder auch Eier von den Fraßpflanzen gesammelt und die Tiere im Labor aufgezogen. Für die molekularbiologische Analyse wurden ausschließlich Imagines eingesetzt. Für jedes Individuum wurde das Geschlecht festgehalten. Die Tiere (für manche Populationen nur eine Auswahl der gesammelten Individuen) wurden wie oben beschrieben (vergleiche Abschnitt 2.1.1) präpariert, um die Artbestimmung anhand der Genitalmorphologie

Tab. 7 Präzisierung der Fundorte für die Populationen Bad Segeberg und Bretten. Entfernung Itzstedter See - Mözener See: ca 17km; Büchig - Karlsruhe: ca 29km; Maulbronn - Karlsruhe: ca 37km; Büchig - Maulbronn: ca 13km.

Population		Bundesland	Anzahl
Bad Segeberg	Itzstedter See	Schleswig-Holstein (SH)	21
	Mözener See		15
Bretten	Büchig	Baden-Württemberg (BW)	48
	Karlsruhe		5
	Maulbronn		36

durchführen zu können. Ausnahmen betreffen die Individuen der Populationen Büchen und Treia; hier fand keine Genitalpräparation statt, jedoch wurde nach Abtrennung des Abdomens jeweils der Rest des Käfers wie oben beschrieben in einer Sammlung hinterlegt.

2.2.2. DNA-Extraktion und Amplifizierung

Die DNA wurde entweder aus dem Abdomen oder aber aus den Beinen der Tiere isoliert (zu den Gründen hierfür siehe unten). Die Extraktion erfolgte nach der Chelex-Methode mittels Mazeration des Gewebes in 1,5ml-Reagiergefäßen mit Hilfe eines Homogenisators und unter Verwendung flüssigen Stickstoffs sowie einer 10%igen Chelex-Suspension (in 1XTE-Puffer, pH 8,0). Hierbei wurden zu jeder mazerierten Probe 500µl der Chelex-Suspension gegeben, diese anschließend mehrfach invertiert und für 15 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wurden diese kurz (30 Sekunden) bei 13,4rpm anzentrifugiert und etwa 200µl des Überstandes in ein neues 1,5ml-Reagiergefäß überführt. Die so isolierte DNA wurde in TE-Puffer bei +4°C gelagert.

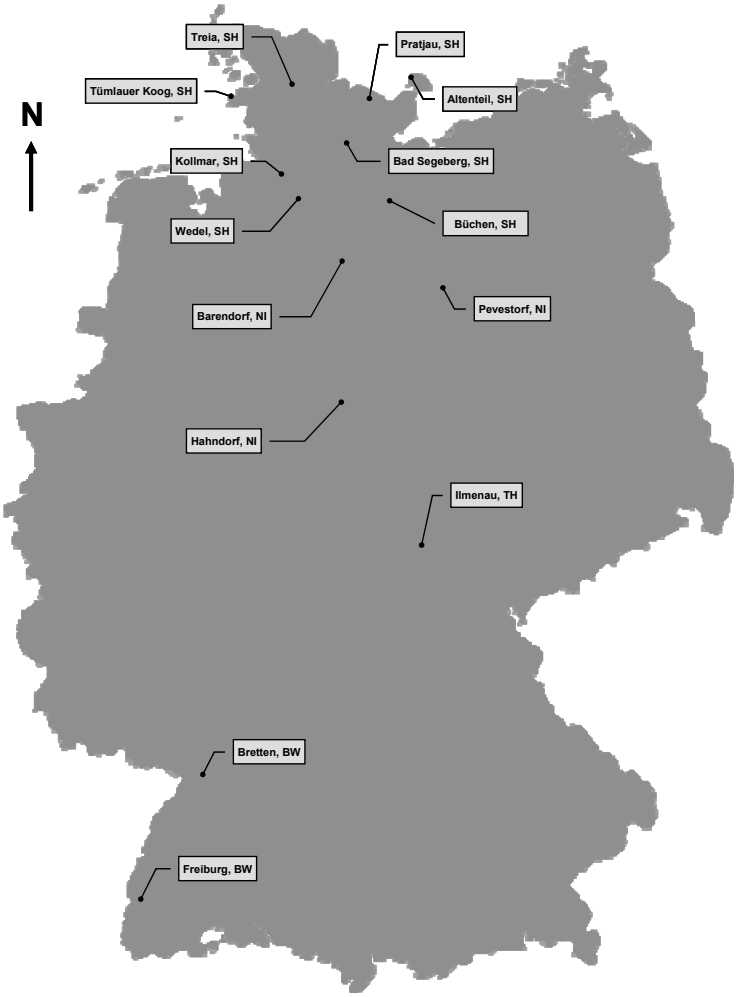

Abb. 12 Fundorte der 12 in der geographischen Analyse der Haplotypen-Verteilung verwendeten Populationen der Art *A. lythri*. BW-Baden-Württemberg; NI-Niedersachsen; SH-Schleswig-Holstein; TH-Thüringen.

Mitunter erwies es sich für eine

erfolgreiche Amplifizierung als notwendig, die DNA-Extrakte 1:100 zu verdünnen (mit H_2O reinst und autoklaviert). Für die Amplifikation eines etwa 1400bp langen mtDNA-Fragments von *COI* wurde die Primer-Kombination S1634/A3020 (Tab. 4) unter Verwendung des in Abschnitt 2.1.2 genannten Programms zur Amplifizierung von *COI/II* verwendet. In einigen Fällen konnten aus Extrakten, die aus dem Abdomen gewonnen wurden, keine Amplifikate erhalten werden; hier erwiesen sich DNA-Extrakte aus den Beinen der Tiere als erheblich besser geeignet. Eine Ursache könnte die große Menge Eier im Abdomen der Weibchen gewesen sein, da dieses Phänomen bei aus Abdomen von Männchen extrahierter DNA nicht auftrat.

2.2.3. Restriktionsanalyse (RFLP) und Auswertung der Daten

Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI, HaeIII und HinfI (Fermentas, St. Leon-Rot) und den jeweils zugehörigen Puffern für 100% Enzymaktivität (Fermentas; Tab. 8) analysiert. Die Brauchbarkeit dieser Enzyme zur Unterscheidung der Haplotypen wurde zuvor mit Hilfe der für die phylogenetische Analyse ermittelten Sequenzen unter Verwendung des Programms Sequencher 4.6 (Gene Codes Corporation) überprüft (Tab. 9; zu den jeweils definierten mtDNA-Haplotypen siehe Abschnitt 3.2).

Tab. 8 Die bei der Restriktionsanalyse zur Bestimmung der mitochondriellen Haplotypen der Art *A. lythri* eingesetzten Enzyme sowie die zugehörigen Enzympuffer.

Marker	Enzym	Puffer
COI	BamHI	Unique (BamHI-Puffer)
	HaeIII (BsuRI)	Red
	HinfI	Red

Für jede positive Probe wurde ein 20µl-Verdau mit je 2µl Puffer und 0,2µl Enzym angesetzt. Je nach Stärke der jeweiligen PCR-Bande erfolgte eine Zugabe von H_2O oder unterblieb (es wurden maximal 18µl unverdünntes PCR-Amplifikat eingesetzt). Der Restriktionsverdau erfolgte bei 37°C für mindestens 4 Stunden oder über Nacht in einem Wärmeschrank. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines 1,5%igen Agarosegels (3,75g Agarose in 250ml 1XTBE) aufgetrennt und nach Färbung in einem Ethidiumbromid-Bad und Sichtbarmachung der DNA über UV-Licht gegen einen adäquaten Größenstandard photographiert und analysiert. Da die tatsächliche Basenabfolge für jeden der bei *A. lythri* auftretenden Haplotyp

Tab. 9 Die mittels der Restriktionsenzyme BamHI, HaeIII und HinfI aus dem Ausgangsamplifikat (*COI*) erzeugten Fragmentlängen. Die Angaben zu den Fragmentlängen beziehen sich auf jeweils exakt gleich lange Ausgangsfragmente.

COI	Fragmentlängen für ***COI*** (1381bp) für das jeweilige Enzym		
Haplotyp	**BamHI**	**HaeIII**	**HinfI**
HT1	511 - 870	98 - 309 - 974	135 - 598 - 648
HT1*	511 - 870	98 - 309 - 974	135 - 175 - 186 - 237 - 648
HT2	*non-cutter*	98 - 402 - 881	361 - 1020
HT2*	*non-cutter*	98 - 402 - 881	135 - 361 - 885
HT3	511 - 870	98 - 1283	135 - 175 - 1071

aufgrund der durchgeführten Sequenzierungen bereits bekannt war, ließen sich für jeden mtDNA-Typ die Schnittstellen und somit die genauen Fragmentlängen im Vorwege ermitteln und jedes auf den Gelen sichtbare Schnittmuster konnte unmittelbar einem definierten Haplotyp zugeordnet werden (Tab. 9).

Die aus den Restriktionsanalysen erhaltenen Daten zum Vorhandensein beziehungsweise Fehlen der jeweiligen Enzym-Schnittstellen wurden verwendet, um mittels des Programms Network (Version 4.5.1.6., Fluxus Technology Ltd., 2004-2010) über die entsprechende Datenmatrix ein Haplotyp-Netzwerk aller bei *A. lythri* nachgewiesenen Haplotypen zu erstellen. Die Diversität der Haplotypen und die Populationsstrukturen wurden unter Verwendung des Programms Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 1992) ermittelt.

2.3. Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität

2.3.1. Aufzucht der Tiere für die Verpaarungsexperimente

Für die Untersuchungen zum Auftreten cytoplasmatischer Inkompatibilität zwischen Individuen der Art *A. lythri*, die unterschiedliche *Wolbachia*-Infektionstypen aufweisen, wurde zwecks Entnahme von Tieren die Population in Wedel (bei Hamburg; Schleswig-Holstein; Abb. 12) ausgewählt, denn von dieser zudem sehr individuenreichen Population war bekannt, dass die dort vorkommenden Käfer mit mehreren unterschiedlichen *Wolbachia*-Stämmen infiziert waren. Von Mitte April bis Anfang Juni 2006 wurden insgesamt 109 Weibchen ("Muttertiere") zur Eiablage angesetzt. Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tab. 10) direkt aus der Population entnommen, wo sie von ihren Fraßpflanzen gesammelt und ins Labor verbracht wurden. Es wurden zum Zweck der Eiablage solche Individuen ausgewählt, anhand deren Körperfülle (angeschwollenes Abdomen) auf eine gute Eiproduktion geschlossen werden konnte, um eine möglichst hohe Nachkommenzahl zu erhalten. Die ausgewählten Tiere wurden in kleinen Plastikzylindern (klare Polystyrolgläser in der Größe 36x83mm, sogenannte „*Drosophila*-Gläschen“) vereinzelt, deren Boden abschließend ausgefüllt war mit angefeuchtetem Blumen-

Tab. 10 Angaben zu den Zuchtbedingungen der 109 zur Erzeugung virgineller Weibchen eingesetzten weiblichen *A. lythri*. Die Tiere wurden nach dem Datum der Vereinzelung in sechs Gruppen unterteilt. Spalte 1: Nummer der Gruppe. Spalte 2: Bezeichnung der Weibchen. Spalte 3: Anzahl der Individuen in der jeweiligen Gruppe. Spalte 4: Datum der Aufsammlung. Spalte 5: Datum der Vereinzelung zur Eiablage. Spalte 6: Dauer der Eiablageperiode (Tage).

Gruppe	Weibchen	N	gesammelt	vereinzelt	Dauer Eiablage
I	♀1 – ♀39	39	15.IV.2006	21.IV.2006	♀01 - ♀30: 24 d ♀31 - ♀39: 26 d
II	♀40 – ♀50	11	15.IV.2006	25.IV.2006	♀40 - ♀50: 22 d
III	♀51 – ♀70	20	15.IV.2006	29.IV.2006	♀51 - ♀70: 20 d
IV	♀71 – ♀90	20	09.V.2006	09.V.2006	♀71 - ♀90: 13 d
V	♀91 – ♀94	4	02.VI.2006	02.VI.2006	♀91 - ♀94: 11 d
VI	♀95 – ♀109	15	10.V.2006	10.V.2006	♀95 - ♀109: 11 d

Steckschaum (für gleichmäßige Luftfeuchtigkeit) sowie mit Blättern der Fraßpflanze *Epilobium hirsutum*. Verschlossen wurden die Gläser mit milbendichten Schaumstoffstopfen, da die Weibchen bei Verwendung normaler Stopfen ihre Eier in den porösen Schaumstoff ablegen, von wo sie nicht wieder hervorzuholen sind. Die Vereinzelung der Tiere erfolgte entsprechend der Zeitpunkte der Aufsammlung im Feld über eine Zeitspanne von über einem Monat (Tab. 10). Jedes Individuum wurde zwecks späterer Zuordnung der Nachkommen mit einer individuellen Bezeichnung (♀1 bis ♀109) versehen. Unter konstanten klimatischen Bedingungen und Langtagsrhythmus bei einer Temperatur von 18°C wurde ihnen nun erlaubt, über mehrere Wochen hinweg Eier abzulegen (Tab. 10). Nach dieser Periode der Eiablage (wenn sich ein Ausbleiben neuer Eier und/oder der baldige Tod der Tiere abzeichnete) wurden die Weibchen einzeln in 1,5ml-Reagiergefäßen (Firma Sarstedt, Nümbrecht) bei -20°C bis zur Durchführung aller weiteren Untersuchungen aufbewahrt.

Die abgelegten Eier wurden mindestens jeden zweiten Tag mit Hilfe eines weichen Pinsels in Petrischalen (Durchmesser 90mm, ohne Nocken) auf trockenem Filterpapier platziert. Das Innere jeder Petrischale wurde zusätzlich mit einen Stück angefeuchteten Steckschaums ausgestattet, um eine gleichmäßige Feuchtigkeitsversorgung zu gewährleisten. Die Eier wurden unter den oben genannten Bedingungen (18°C, Langtag) im Klimaschrank inkubiert. Der Schlupf wurde mindestens jeden zweiten Tag kontrolliert und die frisch geschlüpften Larven umgehend abgesammelt; die Larven wurden in Familiengruppen, das heißt in Gruppen, deren Individuen jeweils vom selben Muttertier abstammten, aufgezogen. Hierzu wurden Plastikzylinder (siehe oben), die ebenso ausgestattet und verschlossen wurden wie im Falle der eierlegenden Weibchen, verwendet. Die Larven wurden ausschließlich mit ihrer natürlichen Fraßpflanze, *Epilobium hirsutum*, gefüttert, welche zu diesem Zweck in regelmäßigen Abständen frisch im Feld gesammelt wurde. Hierbei wurde besonderes Augenmerk darauf gerichtet, dass die verfütterten Blätter frei von Eiern oder Larven waren; gegebenenfalls wurden die Pflanzen gereinigt. Larven, die sich kurz vor der Verpuppung befanden (zu erkennen an der Einstellung der Nahrungsaufnahme, dem Verlassen der Fraßpflanze und einer deutlichen Abnahme der Aktivität) wurden in mit leicht feuchtem Substrat (feiner Kokosfaserhumus aus dem Terraristik-Bedarfshandel, parasitenfrei) gefüllte Petrischalen (Durchmesser 55mm, mit Nocken) überführt, in denen die Verpuppung stattfand. Unmittelbar nach dem Schlupf wurden die Imagines einzeln in kleine Petrischalen (Durchmesser 55mm, mit Nocken) überführt, in denen sie zum Aushärten vorerst einige Tage verblieben. Die Petrischalen

enthielten einen kleinen Block angefeuchteten Blumensteckschaums sowie je ein Blattstück der Fraßpflanze. Erst nach der vollständigen Aushärtung wurde bei jedem Tier unter dem Binokular das Geschlecht bestimmt. Die Tiere wurden nun, entsprechend ihres jeweiligen Geschlechts sowie der Zugehörigkeit zu einer "Familie", in Gruppen in größeren Plastikdosen mit Deckel (Zylinder der Größe 100x80mm) gehalten. Diese waren am Boden mit mehreren Lagen feuchten Zellstoffs sowie Blättern der Fraßpflanze ausgestattet und mit einem Schaumstoffstopfen verschlossen. Nachdem alle Nachkommen geschlüpft waren, wurden die jeweiligen Anzahlen von weiblichen und männlichen Nachkommen jedes Muttertieres festgehalten. Die Tiere wurden bis Anfang September 2006 weiter im Klimaschrank unter den oben genannten Bedingungen gehalten. Zu dieser Jahreszeit geht die Futterpflanze im Feld zur Neige. Die Tiere wurden nun in neue, mit feuchtem Kokosfaserhumus etwa drei Zentimeter hoch angefüllte Plastikzylinder (Größe wie oben angegeben) umgesetzt und hierin für drei Monate im Kühlschrank bei +4°C belassen, um die Diapause zu simulieren, die die Imagines im Freiland einlegen, bevor sie sich im Frühling des folgenden Jahres fortpflanzen. Beobachtungen im Labor während dieses Versuches ergaben, dass es ohne oder nach zu kurzer Diapause nicht zur Verpaarung zwischen den Tieren kommt.

2.3.2. Bestimmung der mtDNA-Haplotypen und der *Wolbachia*-Infektion

2.3.2.1. Vorbereitung der Proben und DNA-Extraktion

Für jedes der 109 im Freiland gesammelten Weibchen, auf deren Nachkommen alle weiteren Untersuchungen zum Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität beruhten, wurde eine Genitalpräparation durchgeführt (vergleiche Abschnitt 2.1). Die Extraktion der Gesamt-DNA der Muttertiere erfolgte mittels Chelex wie in Abschnitt 2.2 beschrieben.

2.3.2.2. Amplifizierung der mtDNA (*COI*) und der bakteriellen Gene *ftsZ* und *wsp*

Zur Bestimmung des mtDNA-Haplotyps der Muttertiere wurden Amplifizierungen von *COI* (Länge des Abschnitts ca 1400bp) wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Feststellung des *Wolbachia*-Infektionstyps erfolgte mittels Amplifikation des *wsp*-Gens (Länge des Abschnitts ca 650bp) mit den *Wolbachia*-spezifischen Primern wsp-f und wsp-r (Tab. 11). Zusätzlich wurde der Infektionsstatus mittels Amplifizierung des *Wolbachia*-Gens *ftsZ* (Länge des Abschnitts ca 1100bp) überprüft (Primer laut Tab. 11), um fehlerhafte Interpretationen als Folge von Integration einzelner *Wolbachia*-Gene in das Wirtsgenom zu vermeiden. Sämtliche Reaktionen erfolgten unter Verwendung des in Abschnitt 2.1.2

Tab. 11 Die für die Determination des mtDNA-Haplotyps und des *Wolbachia*-Infektionsstatus der *A. lythri*-Muttertiere verwendeten Primer. *entsprechen dem Primerpaar 81F und 691R bei Braig et al. 1998 beziehungsweise Mavingui et al. 2005.

Primer	Sequenz
S1634	5' - ATTGGAGATGAYCAAATTTATAAYGT - 3'
A3020	5' - GGAGCTTAAATCCAATACACTATTCTGCC - 3'
ftsZf1	5' - GTTGTCGCAAATACCGATGC - 3'
ftsZr1	5' - CTTAAGTAAGCTGGTATATC - 3'
wsp-f*	5' - TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC - 3'
wsp-r*	5' - AAAAATTAAACGCTACTCCA - 3'

genannten PCR-Programms. Die Annealing-Temperaturen waren 45°C für *COI* und *ftsZ* beziehungsweise 50 bis 54°C für *wsp*. Die weitere Analyse der Fragmente mittels Restriktionsverdau erfolgte ohne eine vorherige Reinigung der Produkte.

2.3.2.3. Restriktionsanalyse (RFLP) für *Altica-COI* und *Wolbachia-wsp*

Die Bestimmung der Haplotypen der Muttertiere erfolgte auf der Basis von *COI* wie in den Abschnitten 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben. Für die Auswahl der Enzyme zur Bestimmung des Infektionstyps wurden *wsp*-Sequenzen der drei bekannten *Wolbachia*-Stämme verwendet, die aus den entsprechend infizierten *Altica*-Individuen isoliert wurden (D. Mora, Diplomarbeit 2006). Zur Identifizierung des jeweiligen *Wolbachia*-Stammes wurden die erhaltenen *wsp*-DNA-Fragmente unter Verwendung des Restriktionsenzyms MaeI (Tab. 12; verwendeter Puffer: Tango 1X, Fermentas) verdaut. Der Infektionstyp derjenigen Weibchen, deren Nachkommen für den Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität verwendet wurden, wurde zusätzlich unter Verwendung des Enzyms AciI überprüft, auch wenn dieses Enzym nur eingeschränkte Ergebnisse zulässt, da es zwischen den Stämmen wA2 und wB keine Unterscheidung zulässt (Tab. 12). Die Analyse wurde wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Auf der Grundlage der Ergebnisse wurden im Anschluss die gezielten Verpaarungsexperimente zwischen Individuen mit jeweils unterschiedlichen oder gleichen Infektionstypen durchgeführt. Hierbei bedeuten die Abkürzungen: ♂wA2 beziehungsweise ♀wA2 - Männchen beziehungsweise Weibchen infiziert mit dem Stamm wA2; ♀wA1 - Weibchen infiziert mit dem Stamm wA1; ♀wB - Weibchen infiziert mit den Stamm wB; ♂w- beziehungsweise ♀w- - Männchen beziehungsweise Weibchen nicht infiziert.

Tab. 12 Die von den Enzymen MaeI und AciI erzeugten Fragmentlängen des *wsp*-Genabschnittes (Bestimmung des Infektionstyps bei *A. lythri*). Die Angaben zu den Fragmentlängen beziehen sich jeweils auf exakt gleich lange Ausgangsprodukte.

Enzym	*Wolbachia*-Stamm	Fragmentlängen
MaeI	wA1	*non-cutter*
	wA2	241 - 295
	wB	2 - 66 - 107 - 361
AciI	wA1	113 - 423
	wA2	*non-cutter*
	wB	*non-cutter*

2.3.3. Durchführung der Verpaarungsexperimente

Im Anschluss an die Bestimmung der Haplotypen und der jeweiligen Infektionstypen der Muttertiere wurden nach Ende der Diapause (vergleiche Abschnitt 2.3.1) die Verpaarungen zwischen den Nachkommen dieser Weibchen durchgeführt. Hierbei wurde auf die Vitalität der eingesetzten Weibchen geachtet und offensichtlich kranke oder deformierte Individuen wurden von den Experimenten ausgeschlossen. Die Verpaarungen fanden entweder innerhalb oder zwischen den einzelnen Infektionstypen statt und wurden mit so vielen Replikaten wie möglich durchgeführt. Folgende Kombinationen waren möglich: ♂wA2 x ♀wA1, ♂wA2 x ♀wB, ♂wA2 x ♀w-, ♂w- x ♀wA2, ♂w- x ♀wA1, ♂w- x ♀wB, ♂wA2 x ♀wA2, ♂w- x ♀w-. Inzucht wurde vermieden, obwohl natürlich unklar war, inwieweit Inzucht schon im Freiland eine Rolle spielt; die Seltenheit von Männchen in der verwendeten Population lässt möglicherweise auf einen hohen Grad an Inzucht schließen.
Es wurde immer nur ein Weibchen mit einem Männchen in jeweils einem Polystyrolglas der Größe 36x83mm gepaart. Aufgrund der geringen Anzahl von Männchen wurden diese zum größten Teil mehrfach verpaart, jedoch immer nur mit einem Weibchen zur Zeit. Die Behälter waren mit einer den Boden bedeckenden Lage feuchten Blumen-Steckschaums sowie jeweils einem Blatt der Fraßpflanze versehen und mittels eines milbendichten Schaumstoffstopfens verschlossen. Auch hier wurde wieder darauf geachtet, dass auf den aus dem Freiland stammenden Pflanzen weder Eier noch Larven vorhanden waren. Die Paare verblieben gewöhnlich für mehrere Wochen zusammen, und die abgelegten Eier wurden regelmäßig abgesammelt und ebenso behandelt wie oben beschrieben (Abschnitt 2.3.1). Die Männchen wurden allerdings nach einiger Zeit von den Weibchen getrennt, um sie mit neuen Weibchen zusammenzusetzen. Sowohl Männchen als auch Weibchen wurden, sobald ihre Aktivität abnahm und sie offensichtlich das Ende ihres Lebens erreicht hatten, einzeln in 1,5ml Reagiergefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Sowohl die Anzahl der von jedem Weibchen abgelegten Eier als auch die der hieraus geschlüpften Larven wurde für jede Verpaarung festgehalten, um die Schlupfrate ermitteln zu können. Jedoch wurde ein Großteil der geschlüpften Nachkommen nicht weiter als bis zu einem frühen Larvalstadium aufgezogen. Alle Nachkommen wurden für spätere Untersuchungen einzeln bei -80°C eingelagert.

2.4. Karyologische Untersuchung der Art *Altica lythri*

Das hinlänglich bekannte Phänomen des verschobenen Geschlechterverhältnisses innerhalb der Gattung *Altica* sollte an dieser Stelle mit besonderem Augenmerk auf die Art *A. lythri*

untersucht werden, da offenbar gerade Populationen dieser Art besonders wenige männliche Individuen aufweisen. Zusätzlich wurden jedoch auch Individuen anderer Arten stichprobenartig einer karyologischen Untersuchung unterzogen. Diese beschränkte sich auf das Feststellen der Anzahl der Chromosomen, um möglicherweise vorhandene polyploide Chromosomensätze nachweisen zu können, welche wiederum ein Hinweis auf thelytok-parthenogenetische Fortpflanzung sein könnten.

Für die Untersuchung wurden im April und im Mai 2009 zunächst weibliche Imagines in drei verschiedenen Populationen der Art *A. lythri* gesammelt. Im Einzelnen entstammten 25 Tiere einer Population in Güster am Elbe-Lübeck-Kanal (Schleswig-Holstein), 14 Tiere wurden aus einer Population bei Königreich/Jork bei Stade (Niedersachsen) entnommen, und 11 Tiere entstammten der Population in Wedel (Schleswig-Holstein; vergleiche Abschnitt 2.2 und 2.3.1). Die Tiere wurden wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben zur Eiablage gehalten. Der Boden der Gläser war mit feuchtem Blumen-Steckschaum bedeckt. Nur die unter Laborbedingungen abgelegten Eier wurden für die Bestimmung der Chromosomenzahlen verwendet. Das Verfahren zur Präparation und zur Sichtbarmachung der Chromosomen richtete sich für diese Tiere stark nach der von Webb (1978) entwickelten Methode. Jeweils mehrere ein bis maximal drei Tage alte Eier pro Individuum, gerechnet ab Ablagedatum, wurden für jedes Weibchen getrennt analysiert. Jeweils 1 bis 5 Eier wurden in einem Tropfen einer 0,005%igen Colchicin-Lösung (in 1%iger Natrium-Citrat-Lösung) in 1,5ml-Reagiergefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit einer Pasteur-Pipette wurde die Colchicin-Lösung entfernt und die Eier mit einigen Tropfen Clarke's fluid (Ethanol:Eisessig im Verhältnis 3:1) überdeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hernach wurde wiederum die Flüssigkeit entfernt und die Eier auf in Methanol gelagerte und gereinigte, fettfreie, trockene Objektträger gegeben. Die Eier wurden dann mit einigen Tropfen 50%iger Essigsäure überdeckt und mit dem flachen Ende des Griffes einer Präpariernadel mazeriert. Anschließend wurden die Präparate luftgetrocknet und wie unten beschrieben gefärbt.

Zwei weitere Arten (*A. aenescens* und *A. ericeti*, alle Individuen aus Koberg, Schleswig-Holstein; Tab. 3) sowie einige weitere Einzeltiere der Art *A. lythri* aus weiteren Populationen (Altenteil und Bordesholm, Schleswig-Holstein, sowie Reisdorf bei Ilmenau, Thüringen; Abb. 12) wurden einer Analyse ihrer Chromosomenzahlen unterzogen (alle Tiere stammten aus Aufsammlungen im Jahr 2008). Die Stichprobengröße ist hier mit drei (*A. aenescens*), einem (*A. ericeti*) beziehungsweise vier Individuen (*A. lythri*) allerdings

sehr gering. Für *A. aenescens* wurde je ein Männchen und ein Weibchen sowie eine Puppe, für *A. ericeti* ein Ei, für *A. lythri* aus Altenteil ein Weibchen, für ein Tier aus Bordesholm ein Männchen und im Falle der Tiere aus Reisdorf je ein Männchen und ein Weibchen analysiert. Bei Imagines wurden Eier oder Gewebeproben aus Ovariolen beziehungsweise Hoden untersucht.

Für die Präparation von Eiern der Arten *A. aenescens* und *A. ericeti* wurden diese wie oben beschrieben vorbereitet, die mit Colchicin behandelten und getrockneten Präparate wurden jedoch abweichend hiervon unter leichter Neigung der Objektträger mit einigen Tropfen Fixative-I-Lösung (60% Essigsäure-Ethanol; Eisessig, absol. Ethanol, Aqua Dest 3:3:4) in der Art überdeckt, dass die Lösung sofort an den Rand des Objektträgers lief und dort abtropfte. Danach wurden die Eier mit zwei weiteren Tropfen Fixative-I-Lösung überdeckt und die Eier mit einer Präpariernadel mazeriert. In der Horizontalen wurden die in einzelne Zellen zerlegten Eier nun sofort mit zwei Tropfen Fixative-II-Lösung (absol. Essigsäure-Ethanol; Eisessig, Ethanol 1:1) überdeckt. Nach 15 bis 30 Sekunden wurden alle Flüssigkeitsreste durch Kippen der Objektträger entfernt und vor Antrocknen des Präparates zwei Tropfen Fixative-III-Lösung (Eisessig) hinzugegeben und nach etwa 10 Sekunden durch Abkippen wieder entfernt.

Für die Herstellung von Quetschpräparaten (Hoden der männlichen *A. aenescens* und Puppe derselben Art sowie Hoden und Ovariolen von *A. lythri*) wurden die jeweils verwendeten Gewebe (im Falle der verpuppten Larve das mittlere Drittel des Körpers) in Ringer-Lösung für Insekten freigelegt und auf einem Objektträger (Vorbehandlung wie oben beschrieben) platziert. Auf das Gewebe wurde dann jeweils ein Tropfen 60%iger Essigsäure gegeben. Die Präparate wurden mit einem Deckglas abgedeckt und das Gewebe unter starkem Druck zerquetscht. Die Objektträger wurden dann für etwa 20 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht und die Deckgläschen mit Hilfe eines Skalpells vorsichtig abgehebelt.

Nach erfolgter Trocknung wurden sämtliche der nach unterschiedlichen Methoden hergestellten Präparate in Giemsa-Färbelösung (1:24 verdünnt in Sørensen's Phosphat-Puffer, pH 6,8) für 10 Minuten gefärbt und anschließend in Leitungswasser durch kurzes Spülen gebläut. Zwecks Herstellung von Dauerpräparaten wurden die Präparate mit Einschlußmittel (Roti-Histokitt II) und einem Deckgläschen bedeckt. Die Auszählung der Chromosomen erfolgte bei 1000facher Vergrößerung unter einem Mikroskop.

3. Ergebnisse

3.1. Phylogenetische Untersuchungen: Die drei Genome von *Altica lythri*

Die Ursachen für die Polyphylie der Art *Altica lythri* wurden mittels Ergänzung der bestehenden Phylogenie der Gattung um mtDNA-Daten (*COI/II*) bisher fehlender Arten sowie weitere Individuen bereits enthaltener Arten zu klären versucht. Zur Unterstützung erfolgte eine phylogenetische Analyse zweier unabhängiger nukleärer Marker, des EF1α-Introns sowie ITS2. Zudem wurden *Wolbachia*-Infektionsstatus sowie Infektionstyp (jeweiliger *Wolbachia*-Stamm) für jedes in der mitochondriellen Phylogenie enthaltenen Individuum, sofern infiziert, bestimmt, um beide Datensätze miteinander in Beziehung setzen und möglicherweise Rückschlüsse auf eine Einflussnahme der Bakterien auf die Dynamik der mitochondriellen DNA des Wirtes ziehen zu können.

3.1.1. Die Phylogenie der Gattung *Altica* auf der Grundlage mitochondrieller Daten

Da die Analyse der Phylogenie der Gattung *Altica* neben der Ergänzung möglichst vieler Arten in erster Linie die Aufklärung der von *A. lythri* gezeigten Besonderheiten beabsichtigte, enthält die phylogenetische Analyse eine große Anzahl Exemplare dieser Art. Zahlreiche Individuen wurden gezielt nach dem Ergebnis der für die geographische Analyse der Haplotypenverteilung durchgeführten Bestimmung der mtDNA-Haplotypen (Abschnitt 3.2) ausgewählt; aus diesem Grund geschah für diese Art die Auswahl der Individuen für die Rekonstruktion der Phylogenie nicht in allen Fällen zufällig.

3.1.1.1. Analyse der Sequenzen

Die Analyse von Teilsequenzen der Cytochrom Oxidase-Untereinheiten I und II (*COI/II*) der mitochondriellen DNA der Gattung *Altica* umfasst nach der Ergänzung der Sequenzen weiterer heimischer und nicht-heimischer Arten insgesamt 115 Individuen aus 18 Arten (Abb. 13, Tab. 14). Zu 16 europäischen Arten, von denen zwei bislang unbestimmt sind (*A.* sp. 1 und *A.* sp. 2), kommen je eine Art aus den USA (*A. carinata*, zwei Exemplare) sowie eine Art aus Taiwan (*A. birmanensis*, ein Exemplar). Die Exemplare der beiden Arten *A.* sp. 1 und *A.* sp. 2, die mit den verfügbaren Bestimmungsschlüsseln (Kangas & Rutanen 1992, Doguet 1994, Siede 1998) keiner heimischen Art zugeordnet werden konnten, sind in der phylogenetischen Analyse mit insgesamt sechs Exemplaren (vier Exemplare von *A.* sp. 1 aus Norddeutschland und zwei Exemplare von *A.* sp. 2 aus der Schweiz) vertreten. Weitere Arten stammen aus Schweden (*A. engstroemi*) und aus Spanien (*A. ampelophaga*) (vergleiche Tab. 3 in Abschnitt 2.1.1). Gegenüber der bereits bestehenden

phylogenetischen Analyse (Abb. 9 in Abschnitt 1.7.1.) konnte der mtDNA-Sequenzdatensatz also um die Arten *A. ampelophaga*, *A. brevicollis*, *A. birmanensis*, *A. carinata*, *A. helianthemi*, *A. impressicollis*, *A.* sp. 2 und *A. tamaricis* erweitert werden. Für *A. helianthemi*, *A. lythri*, *A. oleracea*, *A. palustris* und *A. quercetorum* war es zudem möglich, aus unterschiedlichen Populationen stammende Individuen zu analysieren. Umfangreichere Stichproben aus mehr als einer Population konnten von den wenigsten Arten erhalten werden (*A. lythri*, *A. oleracea* und *A. palustris*). Die Arten *A. birmanensis*, *A. brevicollis* und *A. impressicollis* sind durch Einzelindividuen repräsentiert.

Die verwendeten mitochondriellen DNA-Sequenzen umfassen eine maximale Länge von etwa 1740 Basenpaaren. Hiervon entfallen etwa 1380bp auf *COI*, 64bp auf die zwischenliegende $tRNA^{leu}$ und etwa 300bp auf *COII*. In allen Fällen zeigten Amplifizierung und Sequenzierung eine hohe Spezifität der eingesetzten Primer; von jeder DNA-Probe wurde ein distinktes PCR-Amplifikat erhalten. Wie für Insekten typisch, sind die Sequenzen A-T-reich (etwa 70% A+T). Eine Deletion von der Länge eines Basentripletts am Ende der *COI*-Sequenz zeichnet die Arten *A. aenescens*, *A. ampelophaga*, *A. brevicollis*, *A. carinata*, *A. engstroemi*, *A. ericeti*, *A. longicollis*, *A. lythri*, *A. quercetorum*, *A.* sp. 1 und *A.* sp. 2 aus (mit Sternchen markiert in Abb. 13).

Für die 115 analysierten Sequenzen kann aufgrund einer 100%igen Übereinstimmung der jeweiligen Nukleotidzusammensetzungen eine Homogenität der Basenfrequenzen und somit gleiche Bedingungen für die Evolution der Basensequenzen angenommen werden (χ^2-Homogenitätstest, χ^2 = 26,426313 (df = 342), P = 1,00). Der G+C-Gehalt beträgt im Mittel 30% (16,3% C und 13,6% G).

3.1.1.2. Phylogenetische Beziehungen

Die Rekonstruktion der Verwandtschaftsverhältnisse zeigt für fast alle Arten eine distinkte interspezifische Differenzierung in monophyletische Gruppierungen (Abb. 13). Die intraspezifischen genetischen Distanzen liegen hierbei für die monophyletischen Gruppen zwischen 0,0% und 1,2%. Die Analyse ergibt eine geringe Auflösung des Clusters, das die Arten *A. aenescens, A. brevicollis, A. ericeti, A. longicollis*, *A.* sp. 1 sowie einigen Individuen der Art *A. lythri* umfasst. Innerhalb dieser Gruppierung sind die Arten *A. aenescens*, *A. lythri* und *A.* sp. 1 problematisch, da nicht alle Individuen jeweils in einer Gruppe zusammenfallen.

Abgesehen von den einzelnen Individuen der Arten *A. aenescens* und *A.* sp. 1 stellt *A. lythri* hierbei einen umfassenden und sehr bedeutenden Fall von polyphyletischer Gruppierung

innerhalb der rekonstruierten Phylogenie dar. Diese Art ist in der Analyse mit 50 Individuen aus 18 Populationen (16 Populationen aus Deutschland, eine aus Frankreich und eine aus Polen) vertreten. Unter Einbeziehung aller Individuen kann zwischen drei deutlich unterschiedlichen mitochondriellen Haplotypen, im Weiteren bezeichnet als HT1, HT2 und HT3, differenziert werden (Abb. 13, Tab. 13).

Zwischen diesen drei Haplotypen liegen p-Distanzen von 2,1 bis 2,5% zwischen HT1 und HT3, 4,2 bis 4,3% zwischen HT1 und HT2 beziehungsweise 4,2 bis 4,6% zwischen HT2 und HT3 (Tab. 13). Diese Distanzen sind deutlich höher als die p-Distanzen zwischen einigen der monophyletischen *Altica*-Arten und verdeutlichten, dass diese drei Typen mitochondrieller DNA nicht von monophyletischer Herkunft sein können.

Tab. 13 Sequenzdivergenz (p-Distanzen) innerhalb und zwischen den drei mtDNA-Haplotypen der Art *A. lythri*, basierend auf *COI/II*.

p-Distanzen			
	innerhalb	**zwischen den Haplotypen**	
		HT2	**HT3**
HT1	0,0 - 0,64 %	4,20 - 4,30 %	2,10 - 2,50 %
HT2	0,0 - 0,80 %	-	4,20 - 4,60%
HT3	0,0 - 0,52 %	-	-

Innerhalb der von *A. lythri* gebildeten Haplogruppen liegen die p-Distanzen zwischen 0,0 und 0,8% (Tab. 13). Einige Individuen (A lyt 4, A lyt 6, A lyt 11, A lyt 20, A lyt 24, A lyt 48) weisen eine von HT1 abgeleitete Variante auf, die im Folgenden als HT1* bezeichnet wird und sich von HT1 durch eine Divergenz von 0,6% unterscheiden lässt. Wie im Weiteren erörtert werden wird, mag diese Abgrenzung in Zusammenhang mit wichtigen populationsgenetischen Faktoren stehen.

Als Folge dieser nicht-monophyletischen Gruppierung der drei wesentlichen Haplotypen der Art *A. lythri* bleibt die Verwandtschaftsbeziehung zu den anderen Arten teilweise unklar. Lediglich die Gruppierung, die die Individuen mit dem Haplotyp HT1 (inklusive HT1*) umfasst, bildet eine geschlossene Gruppe. Die Individuen des Haplotyps HT3 weisen eine nahe Verwandtschaft mit der Art *A. engstroemi* auf. Für die Gruppe des Haplotyps HT2 dagegen sind die Verhältnisse besonders undurchsichtig, denn die Individuen dieses Haplotyps weisen signifikante Ähnlichkeiten mit mehreren, morphologisch teilweise sehr unterschiedlichen Arten auf; insbesondere sind hier *A. aenescens* (Individuum A aen 1), *A. longicollis* und *A.* sp. 1 (nur die Individuen A sp1 1 und A sp1 3) zu nennen (Abb. 13). Weitere Fälle nicht-monophyletischer Gruppierungen betreffen, wie oben erwähnt, die Arten *A. aenescens* und *A.* sp. 1. So ist eines der drei Individuen der Art *A. aenescens* (A aen 1) durch eine genetische Distanz von 0,6% von den

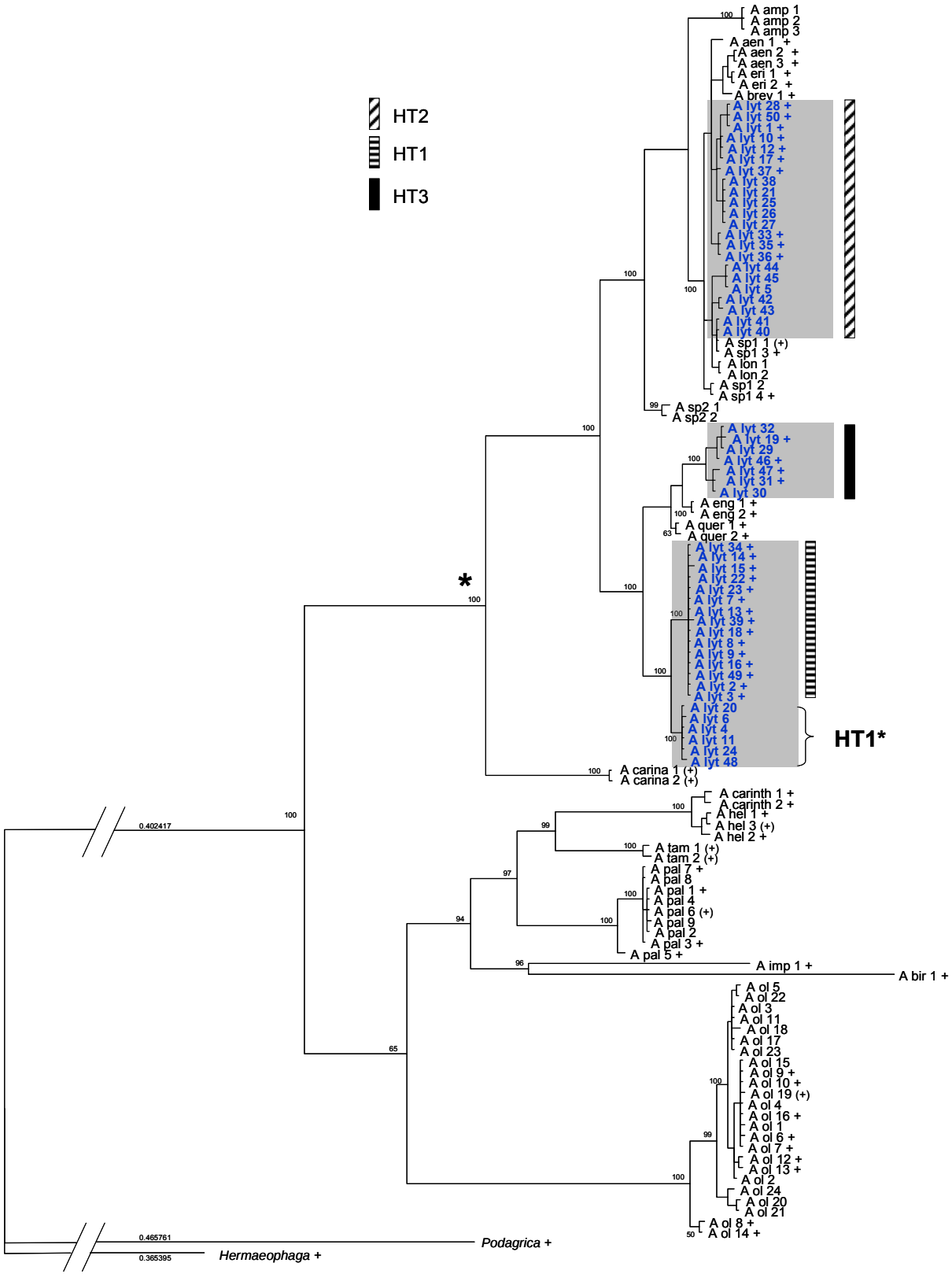

Abb. 13 Die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung *Altica* auf der Grundlage mitochondrieller DNA-Sequenzen (*COI/II*), rekonstruiert unter Verwendung von Bayesian Analysis. Individuen der Art *A. lythri* in blauem Fettdruck und grau hinterlegt; Kennzeichnung des jeweiligen Haplotyps. Der Stern markiert das Auftreten der Deletion eines Basentripletts. Die unterbrochenen Linien zwischen Innen- und Außengruppe zeigen an, dass die Abzweigungen nicht maßstabsgerecht sind; tatsächliche Astlängen sind jeweils angegeben. *Bayesian posterior probabilities* an den Knoten basieren auf zwei unabhängigen Läufen mit je fünf Millionen Generationen +: Infektion mit *Wolbachia*; enthalten in der phylogenetischen Analyse des bakteriellen *ftsZ*-Gens. (+) Infektion wahrscheinlich, aber aufgrund schwacher Amplifikate nicht determinierbar.

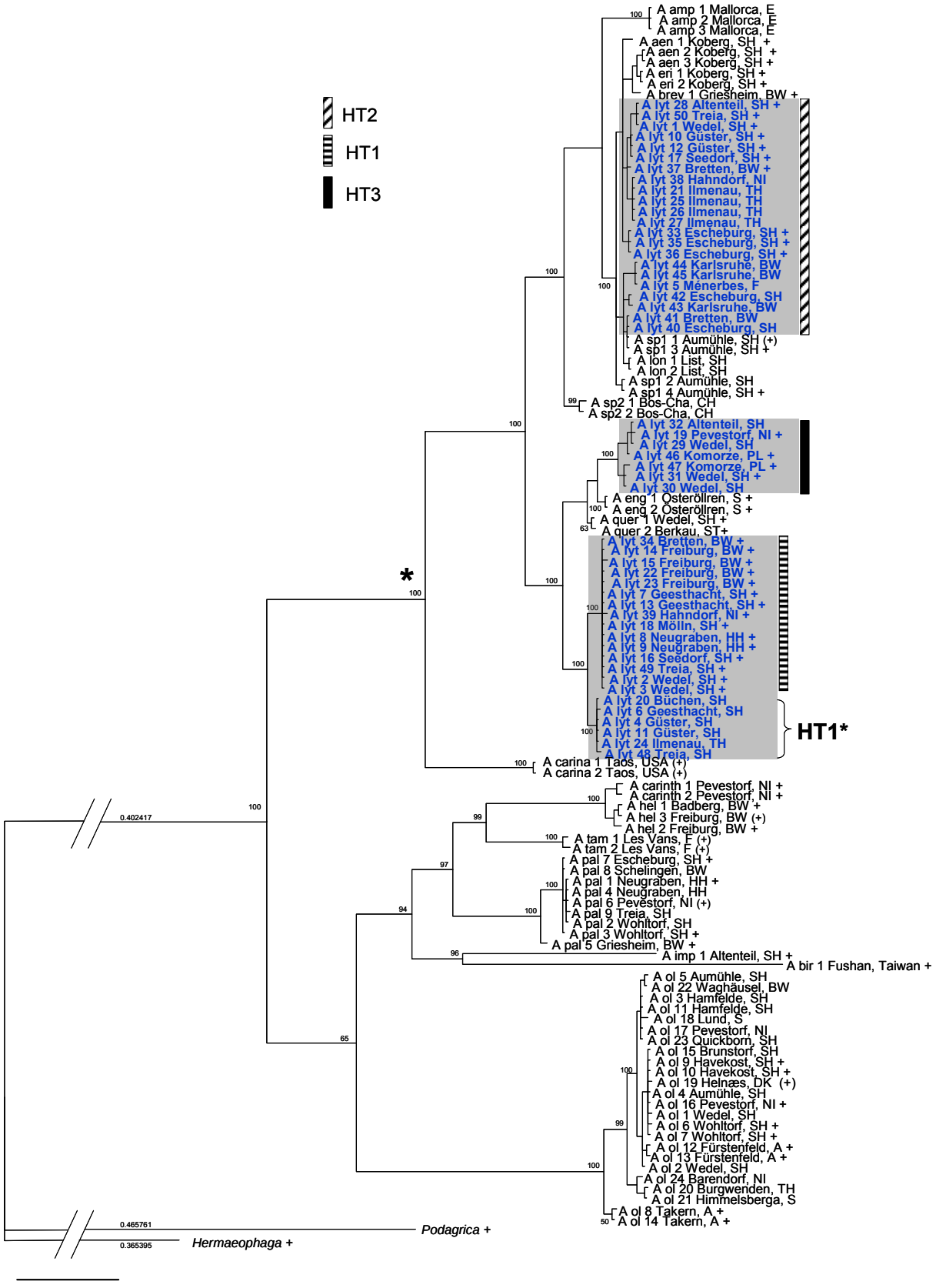

Abb. 14 Die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung *Altica*, rekonstruiert auf der Grundlage mitochondrieller DNA-Sequenzen (*COI/II*) unter Verwendung von Bayesian Analysis (nähere Angaben: vgl. Abb. 13). Individuen mit Angabe der Fundorte (Population und Bundesland bzw. Land). Fundorte innerhalb Deutschlands: BW-Baden-Württemberg, HH-Hamburg, SH-Schleswig-Holstein, NI-Niedersachsen, ST-Sachsen-Anhalt, TH-Thüringen). Fundorte außerhalb Deutschlands: A-Österreich, CH-Schweiz, DK-Dänemark, E-Spanien, F-Frankreich, PL-Polen, S-Schweden.

anderen beiden Vertretern dieser Art abgegrenzt, ein Wert, der die interspezifische Distanz von 0,2% zwischen diesen beiden Individuen und der Art *A. ericeti* deutlich übertrifft. Zum anderen sind zwei Individuen der Art *A.* sp. 1 (A sp1 1 und A sp1 3) aufgrund einer Distanz von 0,35% von den beiden anderen Vertretern ihrer Art getrennt, welche die interspezifische genetische Distanz dieser Individuen zu *A. longicollis* (0,17%) sowie einigen Individuen des HT2-Clusters der Art *A. lythri* (0,0%) deutlich übersteigt.

Die Sequenzunterschiede zwischen den Individuen der Art *A. lythri* und somit die in der phylogenetischen Analyse widergespiegelten Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb dieser bemerkenswerten Art lassen sich nicht mit der geographischen Herkunft der Tiere in Übereinstimmung bringen (Abb. 14); dies gilt nicht nur zwischen, sondern auch innerhalb der verschiedenen Haplotypen. Lediglich innerhalb von einzelnen Populationen, beispielsweise Ilmenau, Escheburg oder Freiburg, sind die Sequenzen so ähnlich, dass die meisten Individuen eines Haplotyps jeweils eine geschlossene Gruppe bilden.

Für die Individuen der Art *A. palustris* gilt dies dagegen nicht: Hier bilden alle Individuen aus Norddeutschland (von Treia bis Pevestorf) eine Gruppe mit sehr geringer Sequenzdivergenz, während das Individuum aus Süddeutschland (Griesheim, Baden-Württemberg) eine deutlich abweichende Sequenz aufweist (Abb. 14). Bei *A. oleracea* findet sich zum Teil ähnliches: Hier unterscheiden sich zwei Individuen aus Österreich (A ol 8 und A ol 14 aus Takern) deutlich von allen anderen Individuen, während allerdings zwei weitere Individuen von einem anderen Fundort in Österreich (A ol 12 und A ol 13 aus Fürstenfeld) nicht von Tieren verschieden sind, die in Norddeutschland gesammelt wurden. Ebenso wenig lassen sich Individuen aus Dänemark und Schweden von in Deutschland gesammelten Tieren unterscheiden.

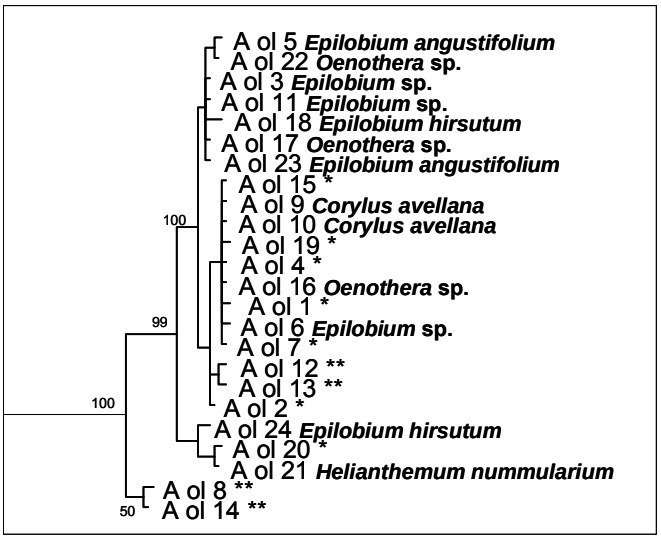

Abb. 15 Die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Art *A. oleracea* mit Angabe der Fraßpflanzenart, auf der das jeweilige Individuum gefunden wurde. Gesamte Phylogenie rekonstruiert auf der Grundlage mitochondrieller DNA-Sequenzen (*COI/II*) unter Verwendung von Bayesian Analysis (nähere Angaben: vgl. Abb. 13). * Pflanze nicht bekannt (entweder keine Angabe oder Kescherfang aus Vegetation); ** Beifang aus Getreidefeldern.

In diesem Zusammenhang bleibt zu erwähnen, dass für die polyphage Art *A. oleracea*, welche sehr unterschiedliche Pflanzenarten aus verschiedenen Pflanzenfamilien nutzt (Tab. 1),

kein Zusammenhang zwischen der Variabilität der mtDNA und der Fraßpflanzennutzung festgestellt werden kann, was Hinweise auf ein Speziationsgeschehen mittels Wirtspflanzenwechsel geben könnte (Abb. 15). Insbesondere bezüglich der für *A. oleracea* genannten Unterart, welche auf *Helianthemum nummularium* (Sonnenröschen, Cistaceae) frißt, ist anzumerken, dass das hier untersuchte Exemplar (A ol 21) innerhalb der übrigen Individuen eingeordnet ist und somit nicht als Vertreter einer Unterart bezeichnet werden kann. Da diese Untersuchung jedoch lediglich auf einer eingeschränkten Auswahl der möglichen Fraßpflanzen beruht, ist nicht auszuschließen, dass umfangreichere Untersuchungen zu anderen Ergebnissen führen könnten, insbesondere dann, wenn variablere Marker zur Auflösung der Phylogenie eingesetzt würden.

3.1.2. Überprüfung der mitochondriellen Phylogenie mittels nukleärer Genabschnitte

Die phylogenetische Analyse der Gattung *Altica* auf der Grundlage nukleärer DNA-Abschnitte (Sequenzen des EF1α-Introns sowie von ITS2) wurde mit dem Ziel durchgeführt, die auf mitochondriellen Sequenzdaten beruhende Analyse zu überprüfen, da diese aufgrund verschiedener Einflüsse offenbar nicht in allen Fällen die korrekten Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Arten widerspiegelt. Die Rekonstruktion einer alternativen Phylogenie war insbesondere im Hinblick auf die Art *A. lythri* wünschenswert. Die Hypothese, dass die polyphyletischen Muster als Folge von Hybridisierungen zwischen Arten und Introgression von mtDNA entstanden sind, sollte auf diesem Wege getestet werden; zudem sollte anhand der unabhängigen, auf nukleären Daten beruhenden Phylogenie die mögliche Herkunft artfremder mtDNA-Haplotypen geklärt werden.

3.1.2.1. EF1α-Intron

Die Analyse der etwa 600bp langen Sequenzen des EF1α-Introns ergab sehr schnell, dass zwischen den von verschiedenen Arten erhaltenen Sequenzen nahezu keine Variabilität nachzuweisen und somit eine Auflösung der Taxa in einer phylogenetischen Analyse nicht möglich war, so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde und lediglich für ITS2 eine größere Anzahl Sequenzierungen für verschiedene Arten durchgeführt wurde.

3.1.2.2. ITS2

Zur Analyse geeignete, das heißt gut lesbare Sequenzen ausreichender Länge des Markers ITS2 wurden von insgesamt 17 *Altica*-Arten beziehungsweise 61 Individuen sowie von den

Außengruppen-Individuen *H. mercurialis* und *P. fuscipes* erhalten. Die Analyse deckt somit einen großen Teil der im Datensatz zur phylogenetischen Analyse der mtDNA enthaltenen Individuen ab, entspricht dem Datensatz der mitochondriellen DNA jedoch aus zwei Gründen nicht vollständig. Zum Einen war es nicht möglich, für jedes im mtDNA-Datensatz enthaltene Individuum eine analysierbare Sequenz zu erhalten; zum Anderen wurde die Datenaufnahme eingestellt, als sich abzeichnete, dass die Variabilität der Sequenzen für ein eindeutiges Ergebnis nicht ausreichend ist. Dennoch erweisen sich die Sequenzunterschiede zwischen den Arten in einigen Fällen als so weit ausgeprägt, dass sich neue Ergebnisse und wichtige Anhaltspunkte daraus ableiten lassen.

A Analyse der Sequenzen

Alle von *Altica* erhaltenen ITS2-Sequenzen umfassen etwas mehr als 400bp Länge. Die erhaltenen PCR-Produkte erwiesen sich im Normalfall als saubere Einzelbanden (zu den Ausnahmen siehe Abschnitt C). Es konnte keine Längenvariabilität zwischen den Einzelproben festgestellt werden (mit Ausnahme einzelner Basendeletionen). Wahrscheinlich aufgrund der Ausbildung von Sekundärstrukturen (ITS-DNA faltet sich zu "stems" und "loops" und bildet eine kleeblattähnliche Struktur aus), die zum Abbruch der Kettenverlängerung während der Sequenzierungsreaktionen führten, enden alle Sequenzen kurz vor dem Beginn des 28S-Genabschnittes, da die Basenfolge auf den Gelen darüber hinaus nicht mehr lesbar war. Eine komplette Sequenz, die den gesamten Bereich vom Ende des 5.8S Abschnittes, die gesamte ITS2-Sequenz sowie den Beginn des 28S-Abschnittes überspannt, konnte dagegen von *H. mercurialis* erhalten werden. Diese vollständige Sequenz ermöglicht es, aufgrund des Vergleichs mit dem bei Gómez-Zurita et al. (2000) veröffentlichten Genabschnitt die Länge des ITS2-Abschnittes bei *Altica* auf 430bp zu schätzen.

Einige Arten sind durch Deletionen eines oder einiger weniger Basenpaare charakterisiert. Das Fehlen einzelner Basen ist allerdings nicht in allen Fällen als Charakteristikum einer bestimmten Art zu sehen, sondern tritt mitunter nur bei einigen Individuen einer Art auf; so beispielsweise bei *A. lythri*.

Es lassen sich keine Hinweise auf Unterschiede in der Nukleotidzusammensetzung zwischen den analysierten Sequenzen fetstellen (χ^2-Homogenitätstest, $\chi^2 = 23.700478$ (df = 180), P = 1,00). Der G+C-Gehalt beträgt 37,4% (17,7% C und 19,7% G).

Die Alignierung der Sequenzen der Arten *H. mercurialis* und *P. fuscipes* zeigt eine starke Konservierung des Abschnittes der 5.8S DNA-Region innerhalb der Gattung *Altica* und

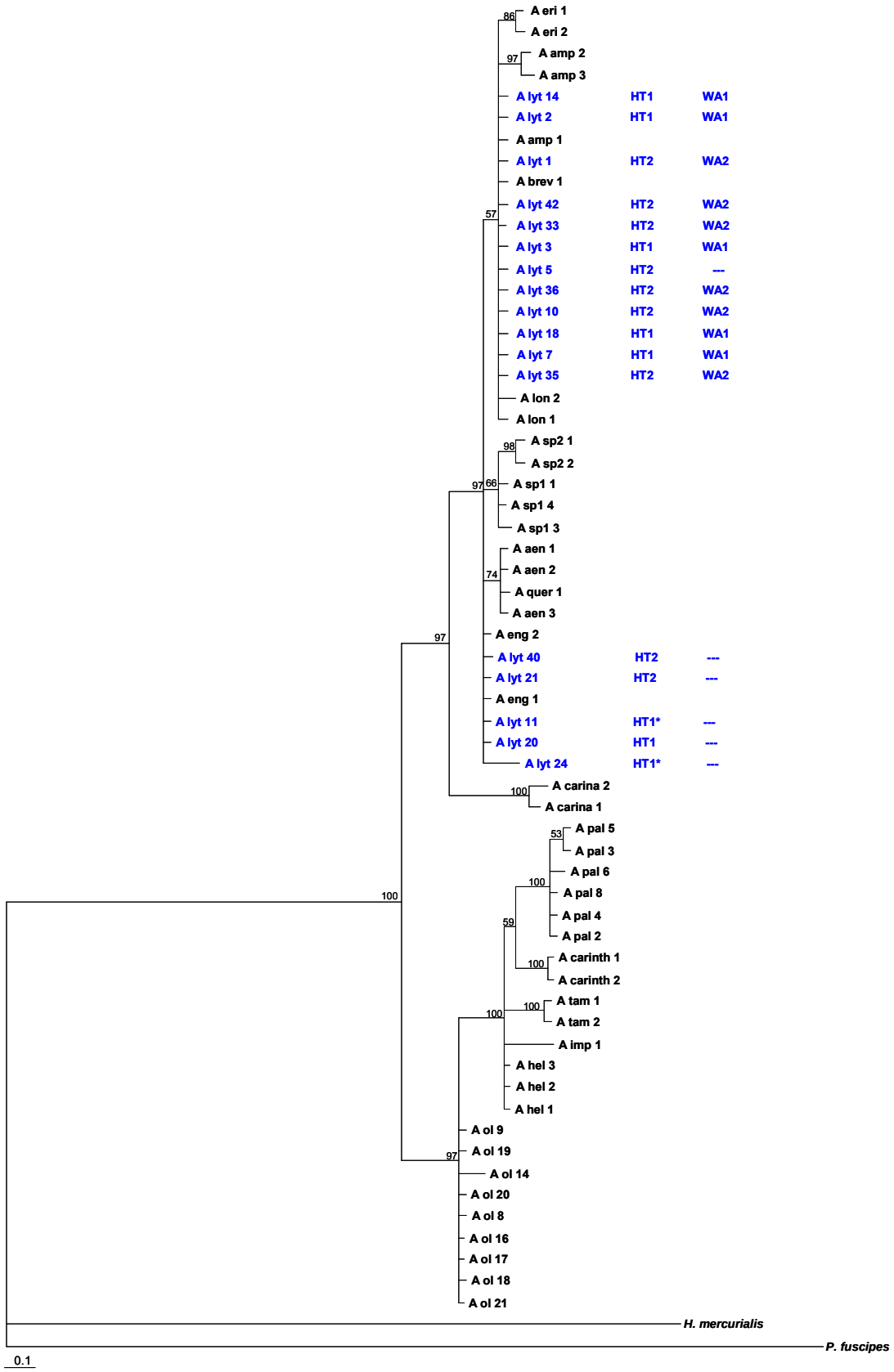

Abb. 16 Phylogenetische Analyse der Gattung *Altica* auf Grundlage der ITS2-Sequenzen einer Auswahl der in der Analyse der mitochondriellen DNA enthaltenen Individuen sowie *H. mercurialis* und *P. fuscipes* als Außengruppe. Berechnung der Verwandtschaftsverhältnisse mittels Bayesian Analysis. An den Knoten sind jeweils die *Bayesian Posterior Probabilities* angegeben. Sie basieren auf zwei unabhängigen Läufen mit jeweils drei Millionen Generationen. *A. lythri* in blau hervorgehoben und mit Angabe des jeweiligen mtDNA-Haplotyps (HT1, HT1*, HT2) sowie des *Wolbachia*-Infektionsstatus. wA1-*Wolbachia*-Stamm wA1; wA2-*Wolbachia*-Stamm wA2; --- *Wolbachia* nicht nachweisbar.

auch im Vergleich mit der Außengruppe. Im Gegensatz hierzu sind die ITS2-Sequenzen zwischen Innen- und Außengruppe hochdivergent mit Sequenzunterschieden von über 30% (bis 50%) mit wenigen kurzen konservierten Regionen.

Die genetischen Distanzen (p-Distanzen) zwischen den ITS2-Sequenzen variieren interspezifisch zwischen 0,0% und 7,5%. Intraspezifische Distanzen umfassen einen Bereich zwischen 0,0% und 1,1% genetischer Distanz. Insgesamt zeigen die Analysen, dass die ITS2-Region aufgrund der Invariabilität für die Auflösung der Phylogenie der Gattung *Altica* nahezu unbrauchbar ist (Abb. 16). Die Auflösung ist für einen großen Teil der Arten minimal oder fehlt ganz. Ein völliges Fehlen intraspezifischer Variabilität (0,0% Sequenzdivergenz) zeigen die Arten *A. aenescens*, *A. carinthiaca*, *A. engstroemi*, *A. ericeti*, *A. helianthemi*, *A. longicollis*, *A. oleracea*, *A.* sp. 2 und *A. tamaricis*. Für *A. aenescens* steht dieser Befund somit im Gegensatz zu der nicht-monophyletischen Darstellung der Art auf Basis der mtDNA (Abb. 13), doch weist *A. aenescens* nach den ITS2-Sequenzen andererseits zu *A. quercetorum* keine genetischen Unterschiede auf. Die nukleäre Phylogenie bestätigt für *A. lythri* die Aufteilung in drei polyphyletische Gruppen nicht, doch sind die Individuen dieser Art auch hier in mehr als eine Gruppe aufgeteilt. Da zwar die genetischen Distanzen zwischen den Individuen von *A. lythri* gering beziehungsweise die Sequenzen teilweise sogar identisch sind, andererseits jedoch auch mehrere andere Arten zu denen von *A. lythri* identische Sequenzen aufwiesen, kann eine Monophylie dieser Art auf nukleärer Basis weder bestätigt noch widerlegt werden. Diejenigen Individuen anderer Arten, die zu *A. lythri* identische oder sehr ähnliche ITS2-Sequenzen aufwiesen, also *A. brevicollis*, *A. ampelophaga* (nur das Individuum A amp 1), *A. engstroemi* und *A. longicollis*, entsprechen dabei zum Teil denjenigen Individuen, die nach der auf der Grundlage der mtDNA erstellten Phylogenie eine nahe Verwandtschaft mit *A. lythri* aufweisen; dabei erweist sich allerdings die Auflösung des entsprechenden Arten-Clusters im Falle der nukleären DNA in einigen Fällen als weitaus geringer.

B Vergleich der nukleären mit der mitochondriellen Phylogenie

Zwischen den ITS2-Sequenzen der Arten *A. ampeloghaga*, *A. brevicollis*, *A. engstroemi*, *A. longicollis* und *A. lythri* fehlt Divergenz weitgehend, so dass gesicherte Aussagen zu den Verwandtschaftsverhältnissen und im Vergleich mit der mitochondriellen Phylogenie nicht möglich sind. Die Sequenzen von *A. carinata*, *A. carinthiaca*, *A. helianthemi*, *A. impressicollis*, *A. oleracea*, *A. palustris*, *A.* sp. 1, *A.* sp. 2 und *A. tamaricis* zeigen dagegen mehr Variabilität untereinander und enthalten ausreichend Information, dass diese Arten als

voneinander getrennte monophyletische Einheiten in Erscheinung treten. Bezüglich dieser Arten unterscheidet sich die auf ITS2 basierende Phylogenie von der mitochondriellen Phylogenie vor allem in der Positionierung der Art *A. helianthemi*, die hier nicht als Schwesterart von *A. carinthiaca* aufgelöst ist.

Auch innerhalb anderer Artenkomplexe weichen die Verwandtschaftsverhältnisse teilweise von denen ab, wie sie anhand des mtDNA-Datensatzes wiedergegeben werden. Ein wesentlicher Unterschied zum Ergebnis der Analyse der mitochondriellen DNA findet sich im Falle der Art *A.* sp. 2, deren beide Individuen auf Grundlage ihrer ITS2-Sequenzen so nah mit den Individuen der Art *A.* sp. 1 verwandt erscheinen, dass beide Taxa (welche sich morphologisch sehr ähnlich sehen) möglicherweise der gleichen Art angehörten und nicht, wie in der auf mtDNA-Sequenzen beruhenden Phylogenie, voneinander isoliert stehen sollten. Ein weiterer Unterschied betrifft die Art *A. quercetorum*, deren ITS2-Sequenz identisch zu der von *A. aenescens* ist, während die Sequenz von *COI/II* für eine nahe Verwandtschaft von *A. quercetorum* mit *A. engstroemi* spricht, welche wiederum mit *A. aenescens* nicht nahe verwandt scheint (Abb. 13). Die Arten *A. brevicollis*, *A. engstroemi*, *A. lythri*, *A. longicollis* sowie ein Individuum der Art *A. ampelophaga* (A amp 1) sind auf der Grundlage ihrer ITS2-Sequenzen nicht voneinander zu unterscheiden; lediglich die Sequenzen einzelner Individuen von *A. lythri* weisen intraspezifische Unterschiede zueinander auf. So sind fünf Individuen (A lyt 11, A lyt 20, A lyt 21, A lyt 24, A lyt 40) aufgrund der phylogenetischen Analyse von allen anderen Individuen dieser Art separiert. Diese fünf Tiere unterscheiden sich in der ITS2-Sequenz aufgrund einer einzelnen Basensubstitution und des Fehlens eines Adenin-Nukleotids. Die Abgrenzung erfolgt nicht in Übereinstimmung mit der Zuordnung dieser Tiere zu einem bestimmten mtDNA-Haplotyp, der Herkunft oder aber des Geschlechts; jedoch korreliert die Separierung mit einer fehlenden oder zumindest nicht determinierbaren *Wolbachia*-Infektion (Abb. 16). Hier soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass bei dem Individuum A lyt 6 ebenfalls keine Infektion nachgewiesen werden konnte, dass dieses Tier jedoch in die Verwandtschaftsgruppe der infizierten Individuen eingeordnet wird.

Obwohl normalerweise hochvariabel, erwiesen sich die ITS2-Sequenzen insgesamt als ungeeignet, um die Phylogenie der Gattung *Altica* lückenlos aufzuklären. Die Trennung zwischen zwei Artengruppen, von denen eine die Art *A. lythri* und ihre nahen Verwandten, die andere *A. oleracea* und verwandte Arten umfasst, wird jedoch auch von der auf diesen Sequenzen basierenden Phylogenie gut unterstützt.

C Probleme bei der Amplifikation von ITS2

Einige der nach oben dargestellter Methode durchgeführten Amplifikationen von ITS2 (vergleiche Abschnitt 2.1) führten bei einer Reihe von *Altica*-Individuen verschiedener Arten jeweils zu einer zweiten, oft sehr deutlichen Bande, die auf ein im Vergleich zu dem zu erwartenden ITS2-Fragment etwas kürzeres DNA-Fragment hinwies (Abb. 17). Um abzuklären, ob es sich hierbei ebenfalls um einen ITS2-Abschnitt handelte, wurde in einem Fall beispielhaft jedes der beiden durch Amplifikation mit der Primer-Kombination ITS3f und ITS4r gewonnenen DNA-Fragmente sequenziert. Zu diesem Zweck wurde das gesamte PCR-Produkt eines ausgewählten Individuums der Art *A. lythri*, welches besonders deutliche Doppelbanden zeigte, auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen und die Fragmente über eine lange Laufzeit bei geringer Voltzahl sorgfältig aufgetrennt. Beide Banden wurden dann einzeln aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA für jede der beiden Banden über eine Gelextraktion (Gel Extraction Kit, Qiagen) aufgereinigt. Sequenzierung nach der oben beschriebenen Methode und nachfolgender Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit der NCBI-Datenbank mittels BLAST ergab für das längere der beiden Fragmente (also die erwartete PCR-Bande) die Bestätigung, dass es sich eindeutig um eine Insekten-ITS2-Sequenz handelte. Bei dem kürzeren DNA-Fragment dagegen handelte es sich um eine pflanzliche ITS2-Sequenz von einer *Epilobium*-Art, also zweifellos um DNA der Fraßpflanze des betreffenden Käfers (in diesem Fall *E. hirsutum*). Folglich erwies es sich als ratsam, zumindest bei Verwendung von ITS2 die Käfer vor der Extraktion der DNA einige Zeit hungern zu lassen, um den Darm zu leeren, oder aber vor der Extraktion von DNA aus dem Abdomen den Darm zu entfernen, oder DNA aus anderen Körperteilen wie etwa den Beinen zu extrahieren. Abgesehen davon konnten die DNA-Abschnitte gewünschter Länge mittels Gelextraktion gereinigt und ebenso sequenziert werden wie direkt gewonnene PCR-Produkte.

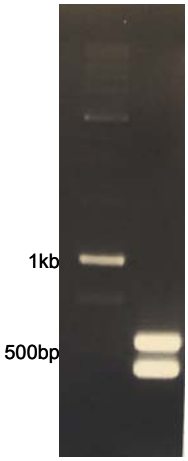

Abb. 17 ITS2-Doppelbande, erzeugt unter Verwendung eines DNA-Extrakts von einem Individuum der Art *A. lythri*.

3.1.3. *Wolbachia*-Infektionen bei *Altica*

3.1.3.1. Analyse des *Wolbachia*-Infektionsstatus anhand von *ftsZ*

Das bakterielle Gen *ftsZ* diente bei diesem Teil der Untersuchung der Rekonstruktion der Phylogenie der bei *Altica* vorkommenden *Wolbachia*-Bakterien und damit der Feststellung

der Diversität der Bakterien, der Häufigkeit der einzelnen Stämme und der Infektionsfrequenz innerhalb der Wirtsgattung.

Art	Code		Herkunft	*Wolbachia* Infektion
A. aenescens	A aen 1	♂	Koberg, SH	wA2
	A aen 2	♀	Koberg, SH	wA2
	A aen 3	♂	**Koberg, SH**	**wA2**
A. ampelophaga	**A amp 1**	♂	**Mallorca, E**	**---**
	A amp 2	♂	**Mallorca, E**	**---**
	A amp 3	♀	**Mallorca, E**	**---**
A. birmanensis	**A bir 1**	**?**	**Fushan, Taiwan**	**wA1**
A. brevicollis	**A brev 1**	♀	**Griesheim, BW**	**wA2**
A. carinata	**A carina 1**	♀	**Taos, USA**	**(+)**
	A carina 2	♂	**Taos, USA**	**(+)**
A. carinthiaca	A carinth 1	♀	Pevestorf, NI	wA1
	A carinth 2	♀	**Pevestorf, NI**	**wA1**
A. engstroemi	A eng 1	♀	Österöllren, S	wB
	A eng 2	♀	Österöllren, S	wB
A. ericeti	A eri 1	♂	Koberg, SH	wA2
	A eri 2	♀	Koberg, SH	wA2
A. helianthemi	**A hel 1**	♂	**Badberg, BW**	**wA1**
	A hel 2	♂	**Freiburg, BW**	**wA1**
	A hel 3	♂	**Freiburg, BW**	**(+)**
A. impressicollis	**A imp 1**	♀	**Altenteil, SH**	**wA1**
A. longicollis	A lon 1	♀	List, Sylt, SH	---
	A lon 2	♀	List, Sylt, SH	---
A. lythri	A lyt 1	♂	Wedel, SH	wA2
	A lyt 2	♀	Wedel, SH	wA1
	A lyt 3	♀	**Wedel, SH**	**wA1**
	A lyt 4	♀	Güster, SH	---
	A lyt 5	♀	Ménerbes, F	---
	A lyt 6	♀	**Geesthacht, SH**	**---**
	A lyt 7	♀	Geesthacht, SH	wA1
	A lyt 8	♀	Neugraben, HH	wA1
	A lyt 9	♀	Neugraben, HH	wA1
	A lyt 10	♀	Güster, SH	wA2
	A lyt 11	♀	Güster, SH	---
	A lyt 12	♂	Güster, SH	wA2
	A lyt 13	♀	**Geesthacht, SH**	**wA1**
	A lyt 14	♀	**Freiburg, BW**	**wA1**
	A lyt 15	♀	**Freiburg, BW**	**wA1**
	A lyt 16	♀	**Seedorf, SH**	**wA1**
	A lyt 17	♂	**Seedorf, SH**	**wA2**
	A lyt 18	♀	**Mölln, SH**	**wA1**
	A lyt 19	♂	**Pevestorf, NI**	**wB**
	A lyt 20	♀	**Büchen, SH**	**---**
	A lyt 21	♀	**Ilmenau, TH**	**---**
	A lyt 22	♀	**Freiburg, BW**	**wA1**
	A lyt 23	♀	**Freiburg, BW**	**wA1**
	A lyt 24	♂	**Ilmenau, TH**	**---**
	A lyt 25	♂	**Ilmenau, TH**	**---**
	A lyt 26	♀	**Ilmenau, TH**	**---**
	A lyt 27	♀	**Ilmenau, TH**	**---**
	A lyt 28	♂	**Altenteil, SH**	**wA2**
	A lyt 29	♂	**Wedel, SH**	**---**
	A lyt 30	♂	**Wedel, SH**	**---**
	A lyt 31	♂	**Wedel, SH**	**wB**
	A lyt 32	♂	**Altenteil, SH**	**---**
	A lyt 33	♂	**Escheburg, SH**	**wA2**
	A lyt 34	♀	**Bretten, BW**	**wA1**
	A lyt 35	♀	**Escheburg, SH**	**wA2**
	A lyt 36	♀	**Escheburg, SH**	**wA2**
	A lyt 37	♀	**Bretten, BW**	**wA2**
	A lyt 38	♀	**Hahndorf, NI**	**---**
	A lyt 39	♀	**Hahndorf, NI**	**wA1**
	A lyt 40	♀	**Escheburg, SH**	**---**
	A lyt 41	♀	**Bretten, BW**	**---**
	A lyt 42	♀	**Escheburg, SH**	**wA2**
	A lyt 43	♀	**Karlsruhe, BW**	**wA2**
	A lyt 44	♀	**Karlsruhe, BW**	**---**
	A lyt 45	♀	**Karlsruhe, BW**	**---**
	A lyt 46	♀	**Komorze, PL**	**wB**
	A lyt 47	♂	**Komorze, PL**	**wB**
	A lyt 48	♀	**Treia, SH**	**---**
	A lyt 49	♀	**Treia, SH**	**wA1**
	A lyt 50	♂	**Treia, SH**	**wA2**

Tab. 14 Die in den phylogenetischen Analysen von *COI/II* und *ftsZ* enthaltenen 115 *Altica* Individuen (18 Arten). In Fettdruck die zur früheren Untersuchung hinzugefügten Individuen. In der ersten Spalte der Name der Art, in der zweiten der Identifikationscode sowie das Geschlecht. Die dritte Spalte bezeichnet den Fundort (angegeben ist jeweils die nächste Stadt oder der nächstgelegene Ort. Fundorte innerhalb Deutschlands: BW-Baden-Württemberg, HH-Hamburg, SH-Schleswig-Holstein, NI-Niedersachsen, ST-Sachsen-Anhalt, TH-Thüringen). Fundorte außerhalb Deutschlands: A-Österreich, CH-Schweiz, DK-Dänemark, E-Spanien, F-Frankreich, PL-Polen, S-Schweden. Die vierte Spalte bezeichnet den Infektionsstatus jedes Einzeltieres beziehungsweise den nachgewiesenen *Wolbachia*-Stamm, der mittels Sequenzierung des *ftsZ*-Gens bestimmt wurde. wA1-*Wolbachia* Stamm wA1; wA2-*Wolbachia* Stamm wA2; wB-*Wolbachia* Stamm wB; (+) schwache Einzelbande, folglich Determination des Infektionstyps nicht möglich; --- *Wolbachia* nicht nachweisbar.

Art	Code		Herkunft	*Wolbachia* Infektion
A. oleracea	**A ol 1**	♀	**Wedel, SH**	**---**
	A ol 2	♀	**Wedel, SH**	**---**
	A ol 3	♀	**Hamfelde, SH**	**---**
	A ol 4	♀	**Aumühle, SH**	**---**
	A ol 5	♀	Aumühle, SH	---
	A ol 6	♀	Wohltorf, SH	wA1
	A ol 7	♀	Wohltorf, SH	wA1
	A ol 8	♀	Takern, A	wA1
	A ol 9	♀	**Havekost, SH**	**wA1**
	A ol 10	♀	Havekost, SH	wA1
	A ol 11	♀	**Hamfelde, SH**	**---**
	A ol 12	♀	**Fürstenfeld, A**	**wA1**
	A ol 13	♀	Fürstenfeld, A	wA1
	A ol 14	♀	Takern, A	wA1
	A ol 15	♀	**Brunstorf, SH**	**---**
	A ol 16	♀	**Pevestorf, NI**	**wA1**
	A ol 17	♀	**Pevestorf, NI**	**---**
	A ol 18	♀	**Lund, S**	**---**
	A ol 19	♀	**Helnæs, DK**	**(+)**
	A ol 20	♀	**Burgwenden, TH**	**---**
	A ol 21	♂	**Himmelsberga, S**	**---**
	A ol 22	♀	**Waghäusel, BW**	**---**
	A ol 23	♀	**Quickborn, SH**	**---**
	A ol 24	♀	**Barendorf, NI**	**---**
A. palustris	A pal 1	♀	Neugraben, HH	wA1
	A pal 2	♀	Wohltorf, SH	---
	A pal 3	♂	Wohltorf, SH	wA1
	A pal 4	♀	Neugraben, HH	---
	A pal 5	♀	**Griesheim, BW**	**wA1**
	A pal 6	♀	**Pevestorf, NI**	**(+)**
	A pal 7	♀	**Escheburg, SH**	**wA1**
	A pal 8	♀	**Schelingen, BW**	**---**
	A pal 9	♀	**Treia, SH**	**---**
A. quercetorum	A quer 1	♀	Wedel, SH	wB
	A quer 2	♀	**Berkau, ST**	**wA1**
A. sp. 1	A sp1 1	♀	Aumühle, SH	(+)
	A sp1 2	♀	**Aumühle, SH**	**---**
	A sp1 3	♀	**Aumühle, SH**	**wA2**
	A sp1 4	♀	**Aumühle, SH**	**wA2**
A. sp. 2	**A sp2 1**	♀	**Bos-Cha, CH**	**---**
	A sp2 2	♀	**Bos-Cha, CH**	**---**
A. tamaricis	**A tam 1**	♀	**Les Vans, F**	**(+)**
	A tam 2	♀	**Les Vans, F**	**(+)**

Bekannt war bislang bereits, dass bei *Altica* drei unterschiedliche *Wolbachia*-Stämme vorkommen, die den beiden Supergroups A und B angehören. Dass diese Stämme bei *A. lythri* mit jeweils einem spezifischen mtDNA-Haplotyp assoziiert sind und ansonsten eine *Altica*-Art immer mit nur einem *Wolbachia*-Stamm infiziert ist, zeichnete sich ebenfalls ab. Die Weiterführung der Analyse der Beziehung *Altica*-*Wolbachia* bestätigt bisherige Ergebnisse, zeigt aber auch neue Erkenntnisse auf und ergänzt bislang gemachte Annahmen.

A Infektionsfrequenzen

Mittels Amplifizierung des *ftsZ*-Gens konnte bei 70 der 115 *Altica*-Individuen (60,9%) beziehungsweise bei 15 der 18 Arten (83,3%) eine Infektion mit *Wolbachia* nachgewiesen werden (Tab. 14). Zudem zeigte sich, dass auch *H. mercurialis* und *P. fuscipes Wolbachia*-Infektionen aufwiesen. Alle 70 infizierten *Altica*-Individuen schienen mit jeweils nur einem *Wolbachia*-Stamm infiziert zu sein; die Sequenzierungsergebnisse lassen keine Hinweise auf das Vorhandensein mehrerer unterschiedlicher Stämme innerhalb desselben Individuums erkennen (wie etwa mehrdeutige Chromatogramme, die andernfalls auf alternative Nukleotide und somit eine Vermischung der DNA mehrerer unterschiedlicher Stämme hätten schließen lassen können). Von drei Arten (*A. ampelophaga, A. longicollis* und *A.* sp. 2) konnten trotz mehrfacher Versuche keine *ftsZ*-PCR-Produkte erhalten werden. Da aus denselben DNA-Extrakten die Daten für die Analyse der mtDNA erhoben wurden, kann als Ursache hierfür nicht eine fehlgeschlagene DNA-Extraktion in Betracht gezogen werden; vielmehr kann angenommen werden, dass *Wolbachia* bei diesen Tieren nicht vorhanden war. *A. carinata* und *A. tamaricis* zeigten sehr schwache PCR-Produkte, die sich nicht sequenzieren ließen; das gleiche gilt für einige Individuen der Arten *A. helianthemi*, *A. oleracea*, *A. palustris* und *A.* sp. 1 (Beispiel: Abb. 18). Eventuell wiesen diese Tiere nur eine geringfügige Bakteriendichte auf. Auf der Grundlage der Amplifikation des *ftsZ*-Gens lassen sich die Infektionsraten für die häufigsten und deshalb in den phylogenetischen Analysen zahlenmäßig am häufigsten vertretenen Arten *A. lythri*, *A. oleracea* und *A.*

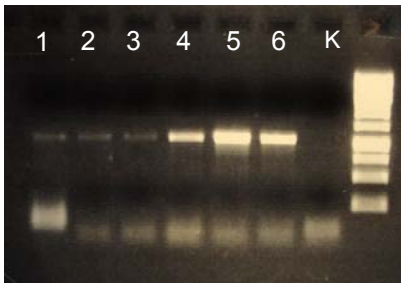

Abb. 18 Beispiel für das Ergebnis einer PCR zum Nachweis von *Wolbachia*-Infektionen bei *Altica* mittels Amplifikation von *ftsZ*. 1: *A. lythri*; 2: *A. palustris*; 3: *A. helianthemi*; 4-5: *A. lythri*; 6: *A. palustris*; K: Leerkontrolle.

palustris (unter Einbeziehung schwacher PCR-Produkte) mit 62,0%, 41,7% beziehungsweise 55,6% angeben.

B Analyse der *ftsZ*-Sequenzen

Die phylogenetische Analyse der bei *Altica* auftretenden *Wolbachia*-Stämme basiert auf etwa 1000bp langen Abschnitten des *ftsZ*-Gens der Bakterien. Zwischen den drei bei *Altica* nachgewiesenen Stämmen fand sich keine Längenvariabilität des untersuchten Abschnitts. Es konnten keine Hinweise auf Unterschiede in der Nukleotidzusammensetzung zwischen den analysierten Sequenzen festgestellt werden. (χ^2-Homogenitätstest, $\chi^2 = 37.251220$, df = 195, P = 1.00). Der G + C-Gehalt der Sequenzen betrug durchschnittlich 40,7% (15,3% C und 25,3% G).

C Bestimmung der Infektionstypen

Mittels BLAST-Suche zeigte sich, dass die für *Altica* infizierende *Wolbachia*-Stämme erhaltenen *ftsZ*-Sequenzen signifikante Sequenzähnlichkeiten mit den typischerweise bei Insekten gefundenen *Wolbachia*-Supergroups A beziehungsweise B (maximal 99% Sequenzübereinstimmung mit Stamm A beziehungsweise maximal 97% Übereinstimmung mit Stamm B) aufweisen.

Tab. 15 *Wolbachia*-Infektionstypen und deren Häufigkeit bei *Altica*, berechnet auf der Grundlage der Arten (Spalten 2 und 3; 18 Arten) beziehungsweise der Individuen (Spalten 4 und 5; 115 Individuen). (+) *Wolbachia*-Stamm nicht determinierbar; --- *Wolbachia* nicht nachweisbar.

Stamm	N Arten	Häufigkeit	N Ind.	Häufigkeit
wA1	8	44,4%	35	30,4%
wA2	5	27,8%	20	17,4%
wB	3	16,6%	7	6,1%
(+)	6	33,3%	8	7,0%
---	7	38,9%	45	39,1%

Die Stämme, die die Gattung *Altica* infizieren, wurden folglich als wA beziehungsweise wB bezeichnet. Hierbei sind 12 *Altica*-Arten mit wA infiziert (nachgewiesen über Sequenzierung bei 88,5% der infizierten Individuen). Drei Arten weisen eine Infektion mit wB auf (nachgewiesen über Sequenzierung bei 11,5% aller infizierten Individuen). Die genetischen Distanzen zwischen den beiden Stämmen wA und wB liegen bei bis zu 15%. Die Arten *A. lythri* und *A. quercetorum* beherbergten jeweils mehr als einen Stamm. Diese Eigenart soll unten ausführlich diskutiert werden.

Die phylogenetische Analyse der *ftsZ*-Sequenzen zeigt deutlich, dass Stamm wA in zwei Stämme unterteilt ist, die im Weiteren mit wA1 beziehungsweise wA2 bezeichnet werden (Abb. 19). Die genetische Distanz (p-Distanz) zwischen wA1 und wA2 beträgt etwa 3%.

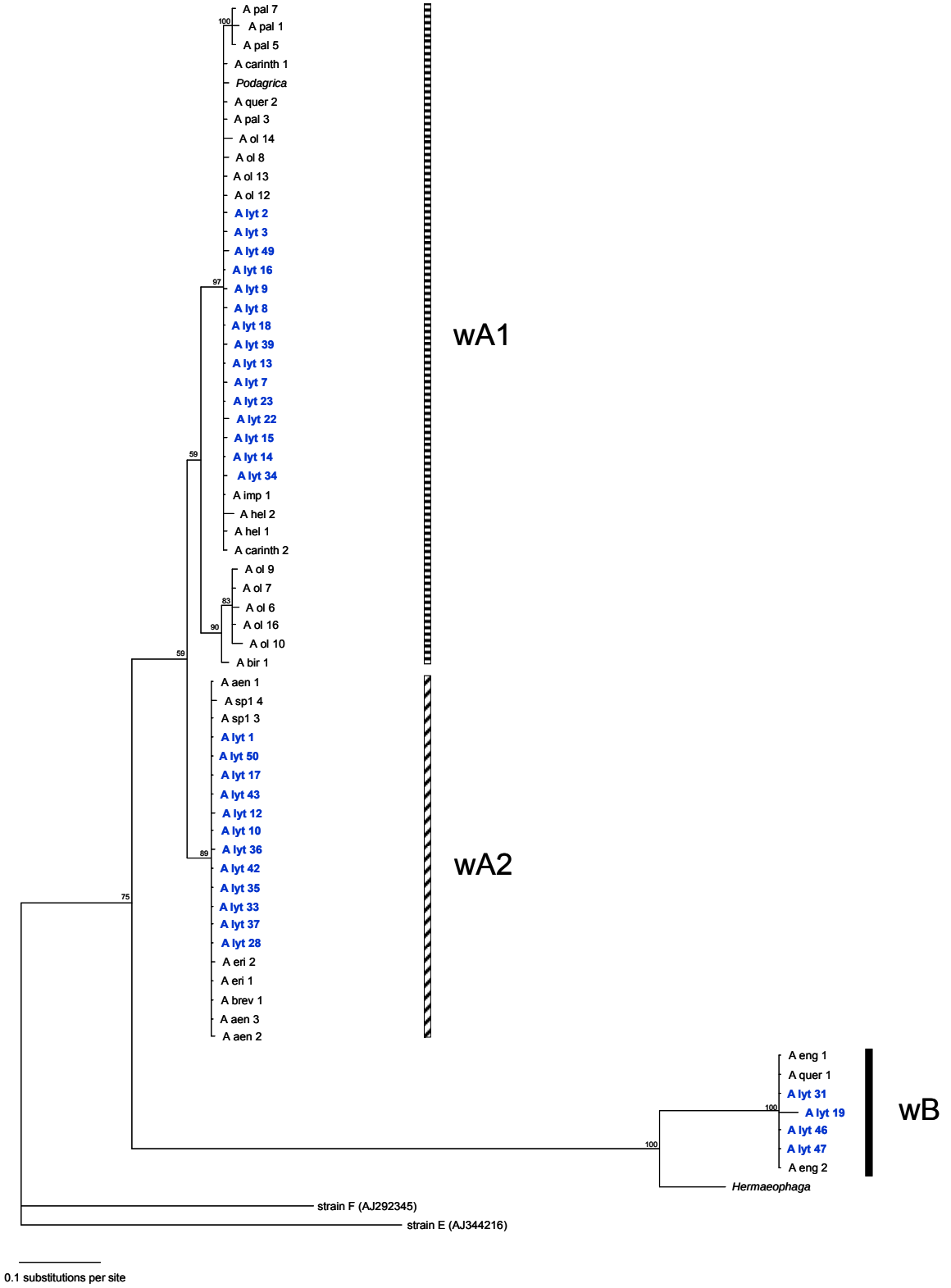

Abb. 19 Phylogenetische Analyse (Bayesian analysis) der bei *Altica* gefundenen *Wolbachia*-Bakterien auf der Grundlage von *ftsZ*-Sequenzen. *Bayesian posterior probabilities* sind an den Knoten angegeben und basieren auf zwei unabhängigen Läufen mit jeweils fünf Millionen Generationen. Individuen der Art *A. lythri* in blau und Fettdruck hervorgehoben. Balken kennzeichnen die drei *Wolbachia*-Stämme wA1, wA2 und wB. Für weitere Informationen siehe Tab. 14).

35 Individuen aus acht Arten waren mit wA1 infiziert; der Stamm fand sich bei 54,1% der infizierten Tiere beziehungsweise bei 30,4% aller analysierten Individuen; Tab. 15). Der Stamm wA1 erscheint weiterhin unterteilt in insgesamt vier Varianten unterschiedlicher Häufigkeit (Abb. 19). Die häufigste Variante fand sich bei insgesamt 27 Individuen aus den Arten *A. carinthiaca*, A. *helianthemi*, *A impressicollis*, *A palustris*, *A. oleracea*, bei einem der beiden Individuen von *A. quercetorum*, bei einem großen Teil der Individuen der Art *A. lythri* sowie bei *P. fuscipes*. Eine der selteneren Formen fand sich bei fünf Individuen der Art *A. oleracea* (A ol 6, A ol 7, A ol 9, A ol 10, A ol 16); eine weitere abgewandelte Form wurde bei drei Individuen der Art *A. palustris* (A pal 1, A pal 5 und A pal 7) nachgewiesen, eine dritte Variante bei *A. birmanensis* (A bir 1). Die Sequenzdivergenzen zwischen den weniger verbreiteten Varianten des Stammes wA1 beziehungsweise zwischen diesen und der häufigen Form liegen zwischen 1,4% und 2,7%, während die Werte innerhalb der häufigen und viel homogeneren Form zwischen 0,0% und 0,3% liegen.

21 *Altica*-Individuen (34,4% aller infizierten Tiere beziehungsweise 17,4% aller Individuen) aus fünf Arten (*A. aenescens*, *A. brevicollis*, *A. ericeti*, ein Teil der Individuen von *A. lythri* sowie *A.* sp. 1) wiesen eine Infektion mit dem Stamm wA2 auf. Somit ist wA2 weit weniger häufig als wA1. Im Gegensatz zu wA1 ist wA2 deutlich einheitlicher und zeigt weit geringere Sequenzdivergenzen von 0,0 bis 0,2%.

Der zur *Wolbachia*-Supergroup B gehörende Stamm wB ist bei *Altica* mit sechs nahezu identischen Sequenzen und einer leicht abgewandelten Variante (0,4% Sequenzdivergenz bei A lyt 19 zu den übrigen *ftsZ*-Sequenzen) vertreten. Sieben Individuen aus acht Arten waren mit diesem Stamm infiziert (11,4% der infizierten Individuen beziehungsweise 6,1% aller Individuen (Tab. 15).

Bei *Podagrica fuscipes* wurde eine Infektion mit *Wolbachia* des Stammes wA nachgewiesen. Es zeigt sich jedoch, dass eine genauere Zuordnung problematisch ist; dies soll im folgenden Abschnitt genauer ausgeführt werden. *Hermaeophaga mercurialis* wies eine Infektion mit einem *Wolbachia*-Stamm der Supergroup B auf. Es handelt es sich hier um eine deutlich abgewandelte Variante des Stammes wB, der bei *Altica* gefunden wurde; die Sequenzdivergenz zwischen den beiden Formen liegt zwischen 2,1 und 2,3%. Die Unterschiede basieren nicht nur auf Basensubstitutionen, sondern bei *H. mercurialis* auch auf dem Fehlen dreier Basentripletts in der *ftsZ*-Sequenz. Dennoch ist der bei *H. mercurialis* nachgewiesene Infektionstyp nach erfolgtem Datenbank-Abgleich eindeutig der Supergroup B zuzuordnen, sollte jedoch als weiterer Stamm von dem *Altica* infizierenden Stamm wB abgegrenzt werden.

Die Sequenzähnlichkeitssuche mittels BLAST ermöglicht eine Zuordnung aller bei *Altica* gefundenen *Wolbachia*-Stämme zu bekannten Infektionsformen (Tab. 16). So zeigt sich für den Stamm wA1 eine hohe Übereinstimmung mit der *ftsZ*-Sequenz des Stammes wForm (99% Sequenzübereinstimmung). Dieser *Wolbachia*-Stamm ruft bei *Neochrysocharis formosa* (Hymenoptera, Eulophidae), einem Endoparasiten, der eine ganze Reihe verschiedener Insekten befällt, Parthenogenese hervor. Die abgewandelte Form des Stammes wA1, die bei fünf Individuen der Art *A. oleracea* gefunden wurde (Abb. 19), weist eine 97%ige Sequenzübereinstimmung jeweils mit den Stämmen wRi, wForm und wNaw auf. Die anderen Varianten des Stammes wA1 dagegen können wiederum dem Stamm wForm zugeordnet werden, jedoch mit einer geringeren Sequenzübereinstimmung (etwa 97%). Die *ftsZ*-Sequenz des Stammes wA2 ähnelt signifikant dem Stamm wCer1 (99% Sequenzübereinstimmung). Dieser Stamm ist von *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae) beschrieben und steht in dem Verdacht, bei dieser Art cytoplasmatische Inkompatibilität hervorzurufen.

Tab. 16 Zuordnung der bei *Altica* nachgewiesenen *Wolbachia*-Stämme zu den jeweils nächstähnlichen bekannten Stämmen (*ftsZ*-Sequenzübereinstimmung mit den bei *Altica* gefundenen Stämmen 97% bis 99%). Spalte 1: Name des Stammes. Spalte 2: Wirtsart, bei der der jeweilige Stamm beschrieben wurde. Spalte 3: Der bei der jeweiligen Wirtsart hervorgerufene Phänotyp. Spalte 4: Zugehörigkeit des Stammes zur jeweiligen "Supergroup". Spalte 5: Entsprechender Stamm bei *Altica*. * abgewandelte Form des Stammes wA1, die bei fünf Individuen der Art *A. oleracea* gefunden wurde. S.G. = *Wolbachia*-Supergroup.

Stamm	**Wirt**	**Phänotyp**	**S.G.**	**entspr. bei *Altica***
wCer1	*Rhagoletis cerasi*	CI ?	A	wA2
wForm	*Neochrysocharis formosa*	PI	A	wA1
wMa	*Drosophila simulans*	CI ?	B	wB
wNaw	*Telenomus nawai*	PI	A	wA1(*)
wRi	*Drosophila simulans*	CI	A	wA1(*)

Der *Wolbachia*-Stamm, der bei *A. birmanensis* gefunden wurde, kann nicht zweifelsfrei einer der beiden Formen des Stammes wA (wA1 und wA2) zugeordnet werden. Zwar ähnelt er nach der phylogenetischen Analyse den Stämmen wRi, wForm und wNaw, also der abgewandelten Form des Stammes wA1 (jeweils 97%), jedoch legt der Datenbankabgleich eine 99%ige Sequenzähnlichkeit mit wCer1 nahe und somit eine Zugehörigkeit zu wA2.

Die bei *Altica* nachgewiesene Form des Stammes wB weist eine hohe Übereinstimmung sowohl mit einem nicht näher benannten *Wolbachia*-Stamm auf, der bei der Schmetterlingsart *Hypolimnas bolina* Male Killing auslöst (Mitsuhashi et al. 2004), gleicht jedoch auch dem Stamm wMa, der bei *Drosophila simulans* und anderen Insekten cytoplasmatische Inkompatibilität hervorruft (93 bis 97% Sequenzübereinstimmung). Diese vergleichsweise geringe Sequenzübereinstimmung spricht jedoch eher dafür, diesen Stamm als eigene Form zu betrachten, die hier somit möglicherweise zum ersten Mal

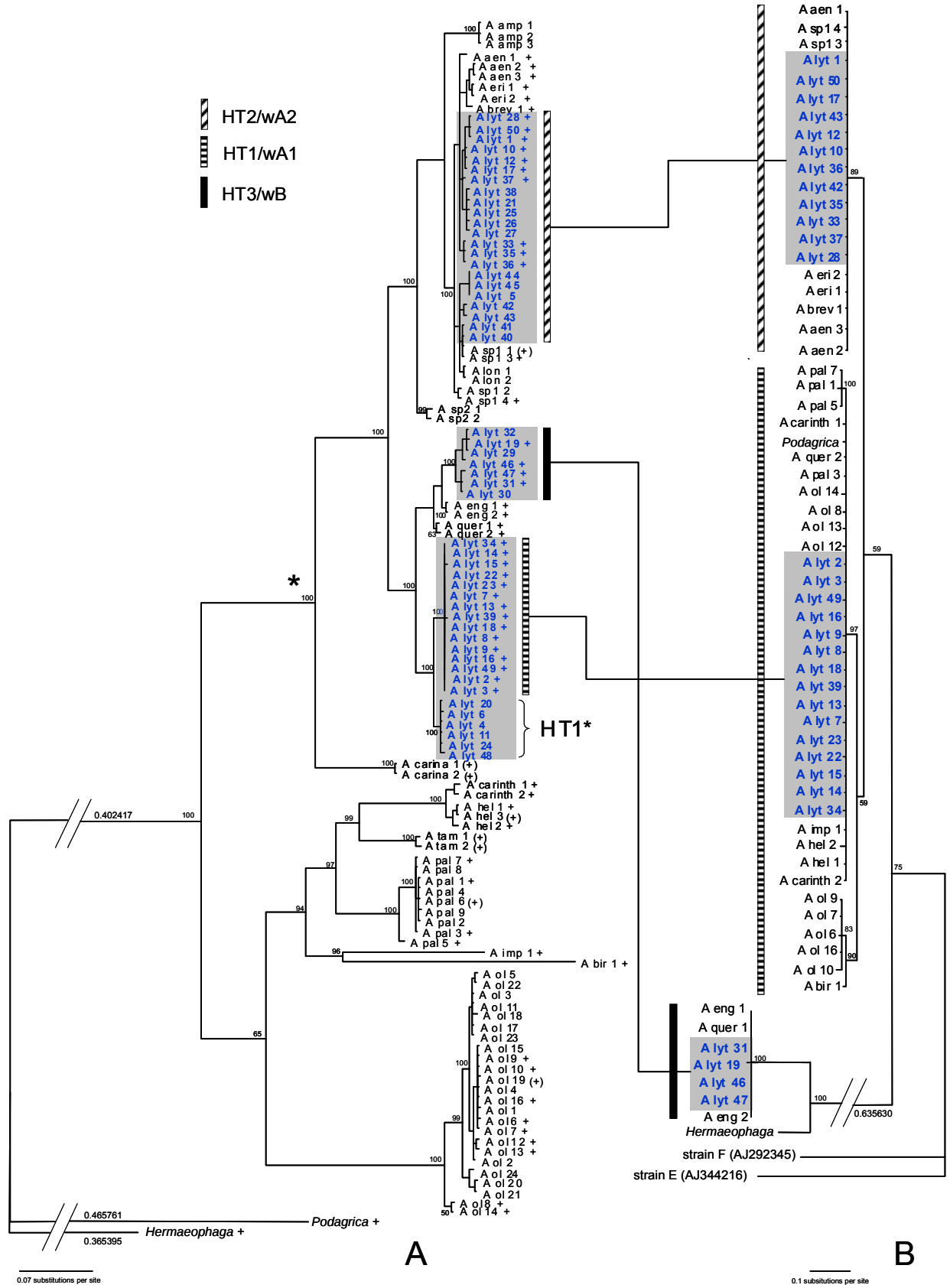

Abb. 20 Phylogenetische Analyse der mitochondriellen DNA-Sequenzen von *Altica* (**A**) und der die entsprechenden Individuen infizierenden *Wolbachia*-Bakterien auf der Grundlage von *ftsZ*-Sequenzen (**B**). Die unterbrochenen Linien zeigen an, dass die Äste nicht maßstabsgetreu wiedergegeben sind; die tatsächlichen Astlängen sind hier jeweils angegeben. *Bayesian posterior probabilities* an den Knoten basieren auf zwei unabhängigen Läufen mit jeweils fünf Millionen Generationen. Individuen der Art *A. lythri* in Fettdruck und grau hinterlegt. Die mtDNA-Haplotypen von *A. lythri* sowie die *Wolbachia*-Stämme sind durch Balken gekennzeichnet und die Assoziation mittels Linien dargestellt. Für weitere Informationen siehe Tab. 14.

nachgewiesen wurde. In diesem Zusammenhang ist die gemeinsame phylogenetische Analyse der bei *Altica* gefundenen *Wolbachia-ftsZ*-Sequenzen zusammen mit *ftsZ*-Sequenzen der MLST- und NCBI-Datenbanken zu erwähnen (Abb. 24); die Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen aus *Altica* isolierten *Wolbachia* mit *Wolbachia* aus zahlreichen weiteren Arthropoden-Taxa ermöglicht hierzu weitreichende Einblicke (Teil C des folgenden Abschnitts).

3.1.3.2. Vergleich der Phylogenien von *Altica* und *Wolbachia*

A Assoziation zwischen *Wolbachia*-Stamm und mtDNA bei *Altica lythri*

Mit Ausnahme zweier Fälle erwies sich jede *Altica*-Art als mit jeweils einem der drei *Wolbachia*-Stämme wA1, wA2 und wB infiziert. Für die nur mit je einem Individuum vertretenen Arten *A. birmanensis* (wA1), *A. brevicollis* (wA2) und *A. impressicollis* (wA1) können diesbezüglich natürlich keine Aussagen getroffen werden; ebenso ist die für viele andere Arten geringe Stichprobengröße zu beachten. Bei den infizierten Individuen der Arten *A. carinthiaca, A. helianthemi*, *A. oleracea* sowie *A. palustris* wurde der Stamm wA1 nachgewiesen; die Individuen der Arten *A. aenescens* und *A. ericeti* sowie zwei Exemplare der Art *A.* sp. 1 waren mit wA2 infiziert, und die beiden Individuen der Art *A. engstroemi* wiesen eine Infektion mit wB auf. Im Gegensatz dazu wurden bei den beiden Individuen der Art *A. quercetorum*, die zwei weit voneinander entfernten Populationen entstammen (Luftlinie etwa 300km), trotz sehr ähnlicher mitochondrieller DNA zwei verschiedene *Wolbachia*-Stämme nachgewiesen; so war das Individuum A quer 1 mit wB, das Individuum A quer 2 jedoch mit wA1 infiziert. Dieses Ergebnis widerspricht der ansonsten beständigen Assoziation eines bestimmten mtDNA-Typs mit einem bestimmten *Wolbachia*-Stamm, wie für *A. lythri* im Folgenden zu erörtern ist.

Tab. 17 *Wolbachia*-Infektionsraten für jede Haplogruppe der Art *A. lythri* (Grundlage: *ftsZ*).

mtDNA Haplotyp	N Ind.	N infizierte Ind.	Infektionsrate
HT1	21	15	71,4%
HT2	22	12	54,5%
HT3	7	4	57,1%

Die Art *A. lythri* zeigt ein auffälliges Muster von Assoziationen zwischen mtDNA und *Wolbachia*-Infektion. Während die beiden Individuen der Art *A. quercetorum* mit zwei unterschiedlichen *Wolbachia*-Stämmen infiziert ist, jedoch weitgehend übereinstimmende mtDNA-Sequenzen aufweist, so dass auch die Artzugehörigkeit nicht angezweifelt werden kann, ist jeder der drei bei *A. lythri* vorkommenden mtDNA-Haplotypen konsequent mit je einem bestimmten *Wolbachia*-Stamm assoziiert (Abb. 20). Ausnahmslos weisen hierbei mit wA1 infizierte Individuen den Haplotyp HT1 auf, mit wA2 infizierte Individuen tragen

HT2, und Individuen, die mit wB infiziert sind, tragen den Haplotyp HT3 (Abb. 20, Tab. 18). Folglich hängt die Zuordnung eines Individuums dieser Art zu einem bestimmten Infektionstyp von der Zugehörigkeit zu einem der drei Haplotypen ab. Weder Haplotyp noch Infektionstyp sind in ihrem Auftreten an bestimmte Populationen gebunden (Tab. 18).

Tab. 18 Alle in der phylogenetischen Analyse der Gattung *Altica* enthaltenen Individuen der Art *A. lythri*, sortiert nach Herkunft, zur Darstellung der Assoziation zwischen mtDNA-Haplotyp (nach COI/II) und *Wolbachia*-Stamm (identifiziert nach Sequenzierung von *ftsZ*, sofern infiziert). Männchen in Fettdruck hervorgehoben. Spalte 1: Auflistung der Individuen mit individuellem Code und Angabe des Geschlechts. Spalte 2: Herkunft der Tiere mit Angabe der nächstgelegenen Stadt/des nächstgelegenen Ortes sowie des Bundeslandes bzw. Landes. BW-Baden-Württemberg; HH-Hamburg; NI-Niedersachsen; SH-Schleswig-Holstein; TH-Thüringen; F-Frankreich; PL-Polen. Spalte 3: Jeweiliger Haplotyp, definiert auf der Grundlage von mtDNA-Sequenzen (COI/II). Spalte 4: Angabe des jeweiligen Infektionsstatus. wA1-*Wolbachia*-Stamm wA1; wA2-*Wolbachia*-Stamm wA2; wB-*Wolbachia*-Stamm wB; --- *Wolbachia* nicht nachweisbar.

Code		Herkunft	mtDNA Haplotyp	*Wolbachia* Infektion
A lyt 28	♂	**Altenteil, SH**	**HT2**	**wA2**
A lyt 32	♂	**Altenteil, SH**	**HT3**	**---**
A lyt 34	♀	Bretten, BW	HT1	wA1
A lyt 37	♀	Bretten, BW	HT2	wA2
A lyt 41	♀	Bretten, BW	HT2	---
A lyt 20	♀	Büchen, SH	HT1*	---
A lyt 33	♂	**Escheburg, SH**	**HT2**	**wA2**
A lyt 35	♀	Escheburg, SH	HT2	wA2
A lyt 36	♀	Escheburg, SH	HT2	wA2
A lyt 40	♀	Escheburg, SH	HT2	---
A lyt 42	♀	Escheburg, SH	HT2	wA2
A lyt 14	♀	Freiburg, BW	HT1	wA1
A lyt 15	♀	Freiburg, BW	HT1	wA1
A lyt 22	♀	Freiburg, BW	HT1	wA1
A lyt 23	♀	Freiburg, BW	HT1	wA1
A lyt 6	♀	Geesthacht, SH	HT1*	---
A lyt 7	♀	Geesthacht, SH	HT1	wA1
A lyt 13	♀	Geesthacht, SH	HT1	wA1
A lyt 4	♀	Güster, SH	HT1*	---
A lyt 10	♀	Güster, SH	HT2	wA2
A lyt 11	♀	Güster, SH	HT1*	---
A lyt 12	♂	**Güster, SH**	**HT2**	**wA2**
A lyt 38	♀	Hahndorf, NI	HT2	---
A lyt 39	♀	Hahndorf, NI	HT1	wA1
A lyt 21	♀	Ilmenau, TH	HT2	---

Code		Herkunft	mtDNA Haplotyp	*Wolbachia* Infektion
A lyt 24	♀	**Ilmenau, TH**	**HT1***	**---**
A lyt 25	♂	**Ilmenau, TH**	**HT2**	**---**
A lyt 26	♀	Ilmenau, TH	HT2	---
A lyt 27	♀	Ilmenau, TH	HT2	---
A lyt 43	♀	Karlsruhe, BW	HT2	wA2
A lyt 44	♀	Karlsruhe, BW	HT2	---
A lyt 45	♀	Karlsruhe, BW	HT2	---
A lyt 46	♀	Komorze, PL	HT3	wB
A lyt 47	♂	**Komorze, PL**	**HT3**	**wB**
A lyt 5	♀	Ménerbes, F	HT2	---
A lyt 18	♀	Mölln, SH	HT1	wA1
A lyt 8	♀	Neugraben, HH	HT1	wA1
A lyt 9	♀	Neugraben, HH	HT1	wA1
A lyt 19	♂	**Pevestorf, NI**	**HT3**	**wB**
A lyt 16	♀	Seedorf, SH	HT1	wA1
A lyt 17	♂	**Seedorf, SH**	**HT2**	**wA2**
A lyt 48	♀	Treia, SH	HT1*	---
A lyt 49	♀	Treia, SH	HT1	wA1
A lyt 50	♂	**Treia, SH**	**HT2**	**wA2**
A lyt 1	♂	**Wedel, SH**	**HT2**	**wA2**
A lyt 2	♀	Wedel, SH	HT1	wA1
A lyt 3	♀	Wedel, SH	HT1	wA1
A lyt 29	♂	**Wedel, SH**	**HT3**	**---**
A lyt 30	♂	**Wedel, SH**	**HT3**	**---**
A lyt 31	♂	**Wedel, SH**	**HT3**	**wB**

Dabei sind die Infektionsraten innerhalb der HT1-Gruppe mit 100% am höchsten (wenn man die offenbar nicht infizierten Individuen des abgewandelten Haplotyps HT1* außer Acht läßt; bezieht man sie mit ein, betrachtet also HT1* nicht als eigenständigen Haplotyp, verringert sich die Infektionsrate auf 71,4%). Für HT1 sind für 100% der Individuen Infektionen mit *Wolbachia* durch die Sequenzierung des *ftsZ*-Gens Sequenzen nachgewiesen, für HT1*-Individuen gibt es keinen Nachweis, ob überhaupt eine Infektion vorliegt. Die HT2- beziehungsweise HT3-Gruppe von *A. lythri* weist deutlich niedrigere Infektionsraten von 54,5% beziehungsweise 57,1% auf (Abb. 22, Tab. 17).

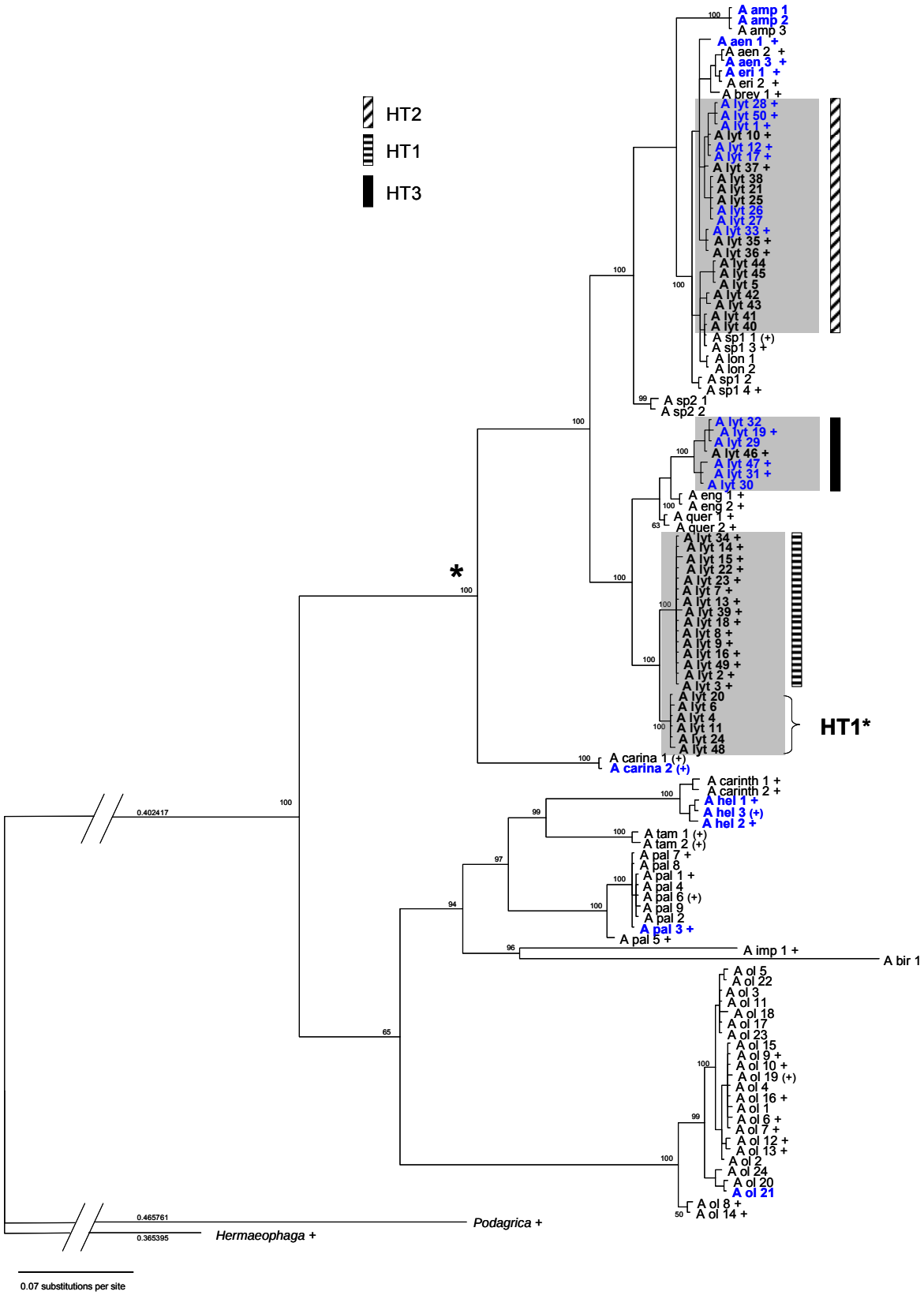

Abb. 21 Die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung *Altica*, rekonstruiert auf der Grundlage mitochondrieller DNA-Sequenzen (*COI/II*) unter Verwendung von Bayesian Analysis. Individuen der Art *A. lythri* in Fettdruck und grau hinterlegt mit Kennzeichnung des jeweiligen Haplotyps. Alle Männchen in blauem Fettdruck hervorgehoben. Für nähere Information vgl. Abb. 13. +: Infektion mit *Wolbachia* und enthalten in der phylogenetischen Analyse des bakteriellen *ftsZ*-Gens. (+) Infektion wahrscheinlich, aber aufgrund schwacher Amplifikate nicht determinierbar.

B Haplotyp, *Wolbachia*-Infektion und das Geschlechterverhältnis bei *Altica*

Die phylogenetische Analyse der mitochondriellen DNA und der bei *Altica* gefundenen *Wolbachia*-Stämme gibt einen ersten Hinweis auf die Ursachen des bei *Altica* häufig beobachteten Phänomens des stark zugunsten des Weibchenanteils verschobenen Geschlechterverhältnisses. Betrachtet man die Unterteilung der Art *A. lythri* in verschiedene Haplogruppen unter Beachtung des Geschlechts der analysierten Tiere, so fällt auf, dass männliche Individuen ausnahmslos entweder HT2 oder HT3 aufwiesen und, sofern sie infiziert waren, die *Wolbachia*-Stämme wA2 beziehungsweise wB trugen (Abb. 21, Tab. 18). Kein Männchen der Art *A. lythri* wies den Haplotyp HT1 oder HT1* auf und keines war mit dem *Wolbachia*-Stamm wA1 infiziert. Bei Weibchen dagegen fanden sich alle bekannten Haplotypen (HT1, HT1*, HT2 und HT3); darüber hinaus ist bemerkenswert, dass alle Weibchen des Haplotyps HT1 mit *Wolbachia* (Stamm wA1) infiziert waren, jedoch bei keinem der Individuen des Haplotyps HT1* (ebenfalls ausnahmslos Weibchen) eine Infektion nachgewiesen werden konnte.

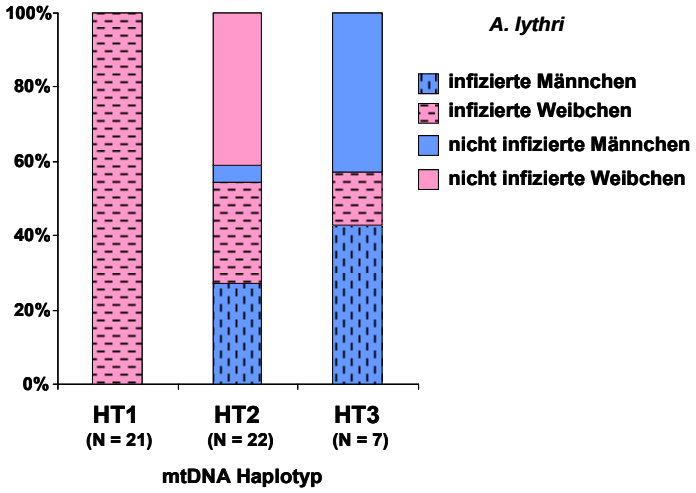

Abb. 22 *Wolbachia*-Infektionsraten (%) in Bezug auf die Anteile infizierter Männchen beziehungsweise Weibchen für die Haplogruppen HT1, HT2, and HT3 der Art *A. lythri*. HT1* ist nicht berücksichtigt, da keine infizierten Tiere gefunden wurden.

Die phylogenetische Analyse bietet somit schon einen ersten Hinweis auf eine Korrelation zwischen der Häufigkeit des Haplotyps HT1 und einer Störung des Geschlechterverhältnisses. Die folgenden Abschnitte, die geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung von *A. lythri* (Abschnitt 3.2) und die Ergebnisse zum Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität (Abschnitt 3.4.), geben auf der Grundlage eines sehr viel umfangreicheren Datensatzes einen erheblich eindeutigeren Einblick in diesen bemerkenswerten Zusammenhang.

Für die übrigen *Altica*-Arten, die in mehr oder weniger großen Individuenzahlen in der Untersuchung vertreten sind, liegen zumindest in Bezug auf den Zusammenhang zwischen Geschlecht und *Wolbachia*-Infektion unterschiedliche Verhältnisse vor (Abb. 21). Es fanden sich bei verschiedenen Arten sowohl nicht infizierte Männchen (*A. ampelophaga*, *A. oleracea*) als auch mit dem Stamm wA2 infizierte Männchen (*A. aenescens*, *A. ericeti*),

jedoch auch Männchen, bei denen der Stamm wA1 nachgewiesen werden konnte (*A. helianthemi*, *A. palustris*).

Bezieht man in die Analyse der drei Haplotypen HT1, HT2 und HT3 der Art *A. lythri* neben der *Wolbachia*-Infektion zusätzlich noch die Information über den Anteil Männchen beziehungsweise Weibchen mit ein, ergibt sich folgendes Bild: Wie bereits erwähnt, waren alle Individuen des Haplotyps HT1 weiblich und ausnahmslos mit *Wolbachia* infiziert. Infizierte Individuen des Haplotyps HT2 waren zu etwa gleichen Anteilen männlichen beziehungsweise weiblichen Geschlechts (Abb. 22). Dagegen fanden sich deutlich mehr nicht infizierte Weibchen als nicht infizierte Männchen dieses Haplotyps. Die geringe Anzahl der Individuen des Haplotyps HT3 (N = 7) lässt keine gesicherte Aussage zu, doch ist hier zumindest der hohe Anteil männlicher Individuen auffällig, von denen etwa die Hälfte eine Infektion aufwies. Nicht infizierte Weibchen traten nicht auf.

C Analyse auf Tendenzen zu Koevolution zwischen *Altica* und *Wolbachia*

Eine weiträumige Betrachtung zeigt, dass die auf mitochondrieller DNA basierende Phylogenie der Gattung *Altica* und die auf *ftsZ*-Sequenzen beruhenden Phylogenie der sie infizierenden *Wolbachia*-Bakterien unterschiedliche Verwandtschaftsverhältnisse widerspiegeln (Abb. 23). Das Ergebnis, dass der Stamm wA1 näher mit wA2 verwandt ist als beide mit wB (3% gegen 15% Sequenzdivergenz), was Sinn macht, da die Stämme wA1 und wA2 zur gleichen Supergroup A gehören, wird von der mitochondriellen Phylogenie der entsprechenden Individuen nicht wiedergegeben. Diese zeigt, dass Individuen der Art *A. lythri*, die mit wA1 infiziert sind, näher mit Individuen verwandt sind, die eine Infektion mit wB aufweisen, als mit Individuen, die mit wA2 infiziert sind, dass also HT1 näher mit HT3 verwandt ist als mit HT2. Dieses Ergebnis sowie die Tatsache, dass *P. fuscipes* mit dem gleichen Stamm infiziert ist wie der Großteil der *Altica*-Individuen, spricht gegen die Aufrechterhaltung einer Infektion über Speziationsereignisse hinaus, gegen eine Cospeziation von Wirt und Parasit und

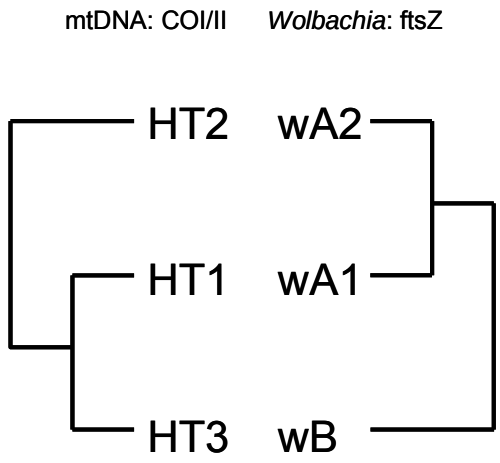

Abb. 23 Beziehung zwischen der auf mtDNA-Daten (*COI/II*) beruhenden Phylogenie der Gattung *Altica* und den Verwandtschaftsverhältnissen zwischen den assoziierten *Wolbachia*-Stämmen.

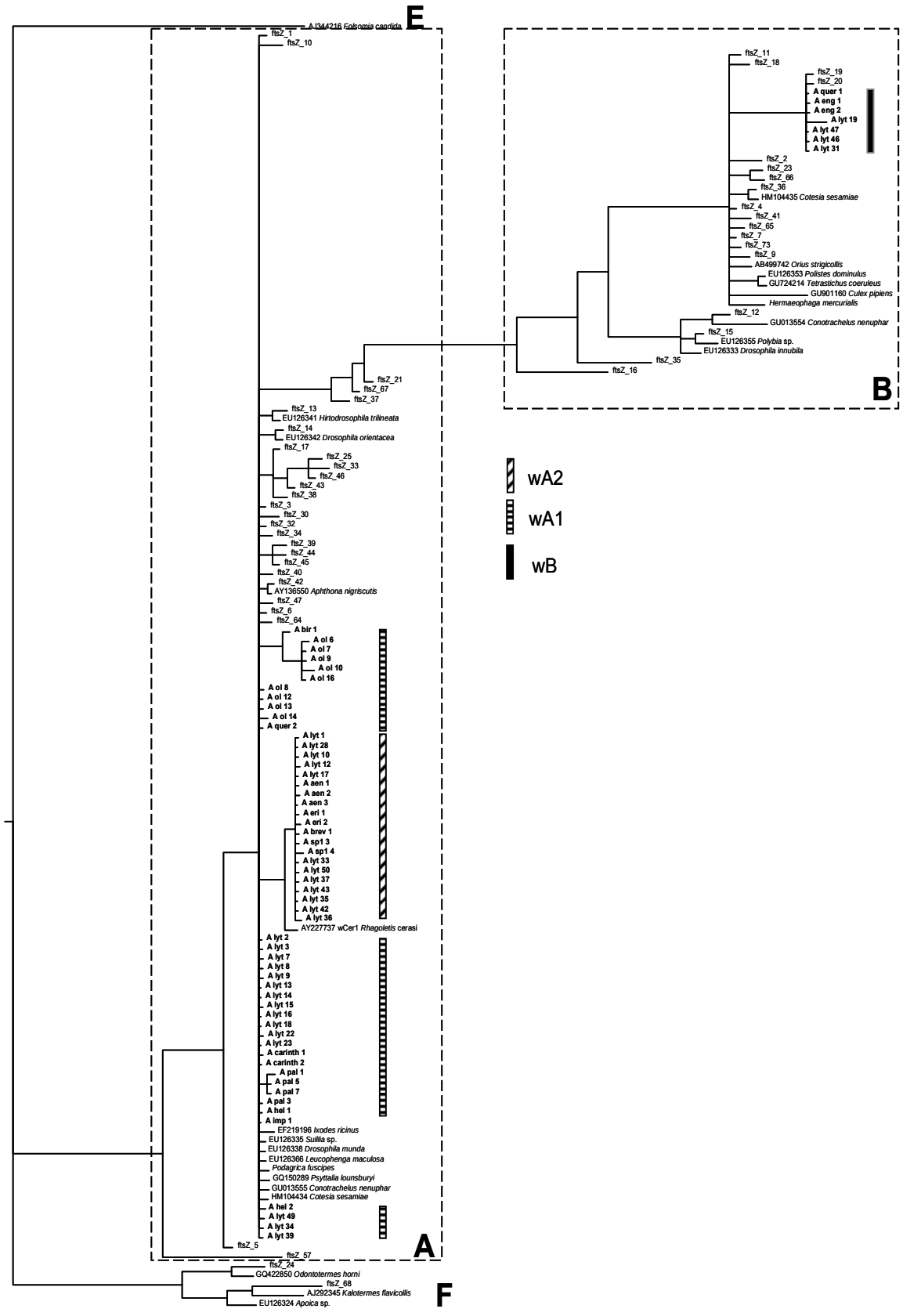

Abb. 24 Phylogenetische Analyse (Bayesian analysis; zwei unabhängige Läufe mit je fünf Millionen Generationen) der bei *Altica* nachgewiesenen *Wolbachia*-Stämme in Kombination mit *ftsZ*-Sequenzen von einer großen Anzahl sehr unterschiedlicher Wirte aus verschiedenen Arthropoden-Taxa. Für Einzelheiten vgl. Tab. 5 in Abschnitt 2.1.4. Die bei *Altica* nachgewiesenen *Wolbachia*-Stämme (wA1, wA2, wB) sind durch Balken auf der rechten Seite gekennzeichnet; die Zugehörigkeit zur jeweiligen Supergroup (A, B, E, F) ist jeweils gekennzeichnet.

für einen unabhängigen Erwerb zumindest des Stammes wB durch *A. engstroemi* und *A. quercetorum* sowie durch einige Individuen der Art *A. lythri*.

Die kombinierte phylogenetische Analyse von *Altica-Wolbachia-ftsZ*-Sequenzen zusammen mit *ftsZ*-Sequenzen der MLST- sowie der NCBI-Datenbanken zeigt, dass keiner der bei *Altica* nachgewiesenen *Wolbachia*-Stämme einzig bei *Altica* vorkommt; tatsächlich weist jeder der drei gefundenen Stämme eine große Ähnlichkeit zu *Wolbachia*-Stämmen und Varianten (Allelen im Falle der MLST-Daten) auf, welche von einem breiten Spektrum unterschiedlicher Wirte bekannt sind (Abb. 24).

3.2. Geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung bei *Altica lythri*

Die phylogenetische Analyse der Gattung *Altica* auf der Grundlage mitochondrieller DNA zeigt eine sehr deutliche Strukturierung der Art *A. lythri* nicht nur auf Artebene, sondern auch auf Populationsebene, die durch das Auftreten sehr unterschiedlicher mtDNA-Haplotypen nicht-monophyletischer Herkunft bedingt ist. Die Verteilung und die Häufigkeit dieser Haplotypen auf einer größeren geographischen Skala zu erfassen war das Ziel dieser Untersuchung. Der geographische Rahmen umfasst Populationen aus einem weiten Bereich Deutschlands und verläuft im Wesentlichen entlang einer Nord-Süd-Achse vom nördlichen Schleswig-Holstein bis ins südliche Baden-Württemberg. Der vollstängige Datensatz findet sich in Anhang A. Zwischen 2006 und 2010 wurden unterschiedliche Anzahlen von Individuen aus 14 Populationen mittels Restriktionsanalyse (RFLP) untersucht. Die von den Haplotypen HT1 beziehungsweise HT2 ableitbaren Varianten HT1* und HT2* wurden zusätzlich jeweils als eigene Haplotypen betrachtet. HT1* wurde bereits bei der phylogenetischen Analyse von HT1 definiert, HT2* jedoch wurde aufgrund der mtDNA-Sequenzen nicht als eigener Haplotyp identifiziert. Da dieser sich jedoch durch das Vorhandensein einer zusätzlichen Enzym-Schnittstelle von HT2 unterscheidet, wird diese Form hier gesondert betrachtet; zudem stellte sich die geographische Verteilung von HT2* als bemerkenswert heraus (Abschnitt 3.2.2).

3.2.1. Daten zur Häufigkeit von Männchen und Weibchen

Die Anzahl der aus jeder Population aufgesammelten Individuen liegt zwischen 11 und 89 Individuen; hierbei sind geringe Stückzahlen in der vorgefundenen geringen Individuenzahl der jeweiligen Populationen begründet. Für jede Population wurde der Anteil männlicher Individuen an der Gesamtzahl aufgesammelter Individuen dokumentiert (Tab. 19, Abb. 27). Bei zwölf Populationen fand sich ein zugunsten der Weibchen verschobenes

Geschlechterverhältnis, für zehn von diesen ist das Ungleichgewicht sogar als extrem zu bezeichnen; bei diesen liegen die prozentualen Anteile männlicher Individuen bei unter 20%. In sieben Populationen fanden sich sogar weniger als 10%, in einer Population (Freiburg) gar keine Männchen. Lediglich die Populationen aus Bad Segeberg (Schleswig-Holstein) und Ilmenau (Thüringen) weichen hinsichtlich der Geschlechterverteilung deutlich von den anderen ab; hier fanden sich 41,7% (unter Berücksichtigung der Daten beider Aufsammlungen, vgl. Tab. 19) beziehungsweise 54,5% männliche Tiere (unglücklicherweise ist für die Population Ilmenau der Umfang der Stichprobe mit jeweils elf Tieren relativ gering). Hierbei weisen Populationen mit einem vergleichsweise hohen Anteil männlicher Individuen bezüglich ihrer geographischen Verteilung augenscheinlich keine Verbindung zueinander auf, sondern finden sich isoliert zwischen Populationen mit stark verschobenem Geschlechterverhältnis, wie etwa am Beispiel der Population aus Bad Segeberg deutlich wird (Abb. 27).

Tab. 19 Angaben zu den in der geographischen Analyse der Haplotypen-Verteilung untersuchten Populationen. Spalte 1: Name der Population, Reihenfolge von Nord nach Süd. BW-Baden-Württemberg; NI-Niedersachsen; SH-Schleswig-Holstein; TH-Thüringen. Spalte 2: Datum (Monat und Jahr) der Aufsammlung. Spalte 3: Anzahl der gesammelten Individuen. Spalte 4: Anteil männlicher Individuen an der Gesamtzahl der gesammelten Individuen.

	Population	Datum	N	% ♂♂
1	Altenteil, SH	VII.2007	83	10,8
2	Treia, SH	IV.2007	36	5,6
3	Tümlauer Koog, SH	IV.2008	89	18,0
4	Pratjau, SH	VII.2007	16	18,8
5	Bad Segeberg, SH	VI.2008	18	44,4
		VIII.2008	18	38,9
6	Kollmar, SH	X.2007	33	9,1
7	Wedel, SH	IV.2006	37	8,1
8	Büchen, SH	IV.2010	63	6,3
9	Barendorf, NI	IX.2007	32	9,4
10	Pevestorf, NI	IX.2007	79	24,1
11	Hahndorf, NI	VIII.2007	61	9,8
12	Ilmenau, TH	IX.2006	11	54,5
13	Bretten, BW	VI.2007	89	27,0
14	Freiburg, BW	VII.2006	33	0,0

Zur Klärung der Frage, ob der Mangel an Männchen ein in Abhängigkeit von der Jahreszeit auftretendes Phänomen ist, welches auf einem früheren Erscheinen männlicher Individuen im zeitigen Frühling sowie ihrem baldigen Verschwinden am Ende der Paarungszeit zurückzuführen ist, wurden die gewonnenen Daten zum prozentualen Anteil männlicher und weiblicher Tiere gegen den jeweiligen Monat der Aufsammlung aufgetragen. Da keine der Populationen über einen Zeitraum von mehreren Monaten beobachtet wurde, wurden die Daten populationsübergreifend und unabhängig vom Jahr der Aufsammlung aufgetragen. Es zeichnet sich kein Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Zeitpunkt (Monat) der Aufsammlung und dem Anteil männlicher Individuen ab (Abb. 25); somit ist ein jahreszeitlicher Trend bezüglich der Anzahl männlicher Tiere nicht zu erkennen. Andernfalls müsste bei im Frühling erhobenen Daten ein deutlich höherer Anteil Männchen vorliegen als im Sommer, bevor die nächste Generation Imagines schlüpft (etwa ab Juni),

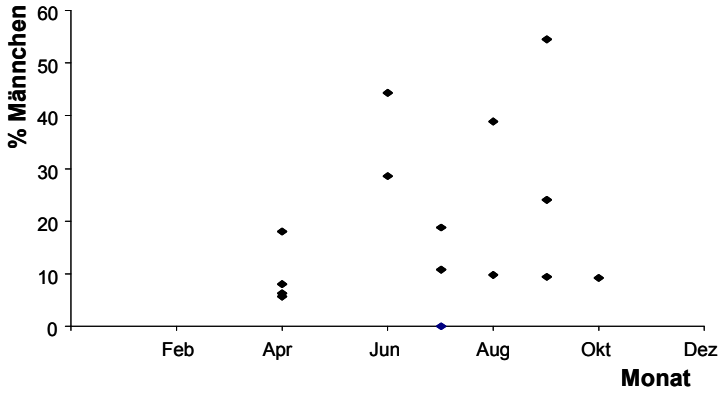

Abb. 25 Darstellung des prozentualen Anteil männlicher Individuen an der Gesamtzahl gesammelter Individuen jeder der 14 Populationen über den Zeitraum April bis Oktober, populationsübergreifend aufgetragen für den gesamten Sammelzeitraum von 2006 bis 2010. Die Populationen aus Bad Segeberg und aus Kollmar sind mit je zwei Datenpunkten vertreten, da jeweils zu zwei Zeitpunkten Aufsammlungen stattfanden.

und mit Schlupf der nächsten Generation sollte der Anteil männlicher Tiere deutlich ansteigen, was jedoch nicht der Fall ist. Vielmehr liegt der prozentuale Anteil männlicher Tiere über die gesamte Aktivitätsperiode in einem relativ eng umfassten Bereich zwischen 5% (0% in Freiburg) bis maximal 30% (Ausnahme: die Population aus Ilmenau). Weitere Hinweise darauf, dass die Seltenheit von Männchen nicht im Zusammenhang mit der Jahreszeit zu sehen ist, finden sich in Abschnitt 3.2.2.

3.2.2. Geographische Verteilung der Haplotypen

Die Anzahl der in den 14 Populationen gesammelten Individuen beträgt insgesamt 693 Tiere, hiervon waren 108 Tiere männlich (15,6%). Die Gesamtzahl genotypisierter Tiere, also die Anzahl Individuen, für die der mtDNA-Haplotyp mittels RFLP-Analyse determiniert werden konnte, beträgt 531; da für manche Individuen kein PCR-Amplifikat erhalten werden konnte, weicht die Anzahl tatsächlich analysierter Tiere von der der insgesamt aufgesammelten und präparierten für die meisten Populationen ab (Tab. 20). Die Darstellungen der Zusammenhänge zwischen dem Auftreten bestimmter mtDNA-Haplotypen und dem Geschlechterverhältnis (Abb. 29), und nur diese, beinhalten dennoch die Gesamtzahlen männlicher und weiblicher Tiere jeder Population (in %), da die Auswirkungen auf die Graphik minimal sind und an der Aussage der Darstellung nichts ändern.

Die Restriktionsanalyse des etwa 1400bp langen mtDNA-Fragments der Cytochrom-Oxydase Untereinheit I (*COI*) identifiziert, auf alle 14 Populationen hochgerechnet, die mtDNA-Haplotypen HT1, HT1*, HT2, HT2* und HT3. Abb. 26 zeigt ein Beispiel für ein RFLP-Gel für 17 Individuen einer Population. Hier lassen sich aufgrund der von HinfI erzeugten Schnittmuster problemlos vier mtDNA-Haplotypen voneinander unterscheiden.

Tab. 20 Geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung bei der Art *A. lythri*. Ergebnisse der RFLP-Analysen (Enzym:HinfI) zur Bestimmung der mtDNA-Haplotypen von 14 Populationen. Spalte 1: Name der jeweiligen Population, sortiert von Nord nach Süd. BW-Baden-Württemberg; NI-Niedersachsen; SH-Schleswig-Holstein; TH-Thüringen. Spalte 2: Anzahl der in jeder Population gesammelten Individuen. Spalte 3: Anteil Männchen an der Gesamtzahl der gesammelten Individuen. Spalte 4: Anzahl der für jede Population genotypisierten Individuen. Spalte 5: MtDNA-Haplotypen der Weibchen. Spalte 6: MtDNA-Haplotypen der Männchen. Untere Zeile: Angabe der Summen insgesamt gesammelter Individuen, insgesamt gesammelter Männchen und der insgesamt genotypisierter Individuen. *Hierher insgesamt sieben weitere mtDNA-Varianten; aufgeschlüsselt in Abb. 33). Die Population Bretten umfasst auch Individuen aus Karlsruhe.

Population	**Individuen gesammelt**	**N ♂♂**	**Anzahl genotypisierter Individuen**	**HT ♀♀**	**HT ♂♂**
Altenteil, SH	83	9	70	HT1, HT1*, HT2	HT2, HT3
Treia, SH*	36	2	33	HT1, HT1*, HT2	HT2
Tümlauer Koog, SH	89	16	54	HT1, HT1*, HT2, HT3	HT2
Pratjau, SH	16	3	12	HT1, HT1*	HT2
Bad Segeberg, SH	36	15	21	HT1, HT1*, HT2	HT2, HT2*
Kollmar, SH	33	3	32	HT1, HT1*, HT2, HT3	HT2
Wedel, SH	37	3	37	HT1, HT2, HT3	HT2, HT3
Büchen, SH	63	4	11	HT1, HT1*	HT2, HT3
Barendorf, NI	32	3	32	HT1, HT1*, HT3	HT2
Pevestorf, NI	79	19	50	HT1, HT1*, HT3	HT2*, HT3
Hahndorf, NI*	61	6	60	HT1, HT1*, HT2*	HT2*
Ilmenau, TH	11	6	11	HT1*, HT2*	HT2*
Bretten, BW*	89	24	75	HT1, HT2*	HT2*
Freiburg, BW	33	0	33	HT1	----
Σ	**693**	**108**	**531**	**HT1, HT1*, HT2, HT2*, HT3**	**HT2, HT2*, HT3**

Die prozentualen Anteile der einzelnen Haplotypen unterscheiden sich zwischen den Populationen teilweise deutlich, und nicht jede der fünf Formen kommt in jeder Population vor (Abb. 28, Tab. 21). Neben diesen fünf verbreiteten Haplotypen ließen sich mit Hilfe der drei Enzyme BamHI, HaeIII und HinfI zudem insgesamt sieben weitere mtDNA-Varianten unterscheiden, die jedoch lediglich bei einigen wenigen Individuen gefunden wurden (insgesamt 14 Individuen mit abweichendem Haplotyp). Diese werden hier aus Gründen der Übersichtlichkeit vorerst dem jeweils nächstähnlichen der häufigen Haplotypen zugerechnet, sollen jedoch bei der weiteren Betrachtung der nachgewiesenen mtDNA-Varianten ebenfalls in die Erfassung der Ergebnisse einbezogen werden (Abschnitt 3.2.4).

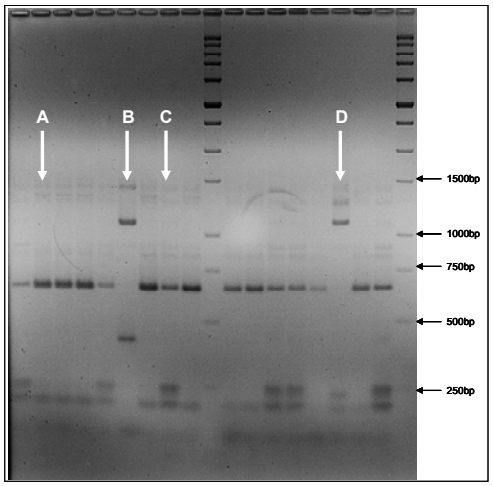

Abb. 26 Beispiel für ein RFLP-Gel für einen Restriktionsverdau mit dem Enzym HinfI (ca 1400bp COI). Abgebildet sind die Ergebnisse für 17 Individuen der Art *A. lythri* aus der Population Barendorf (NI). **A** - HT1; **B** - HT2; **C** - HT1*; **D** - HT3.

In 13 der 14 untersuchten Populationen wurden mindestens zwei unterschiedliche mtDNA-Haplotypen nachgewiesen; lediglich die Population aus Freiburg wies nur einen einzigen Haplotyp (HT1) auf. Die maximale Anzahl von

Tab. 21 Geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung in 14 Populationen der Art *A. lythri*: Angabe der Verteilung der fünf wichtigsten Haplotypen. Spalte 1: Name der jeweiligen Population, sortiert von Nord nach Süd. BW-Baden-Württemberg; NI-Niedersachsen; SH-Schleswig-Holstein; TH-Thüringen. Spalte 2: Anzahl der für jede Population genotypisierten Individuen. Spalte 3: Verteilung der Haplotypen in den Populationen; Angabe der Anzahl der Individuen mit HT1, HT1*, HT2, HT2* und HT3 sowie Anteile in %. Untere Zeile: Summe der insgesamt genotypisierten Individuen sowie die Gesamtanzahlen für jeden Haplotyp und Angabe in Prozent. *Hierher insgesamt sieben weitere mtDNA-Varianten; aufgeschlüsselt in Abb. 33; in dieser Tabelle nicht enthalten). Die Population Bretten umfasst auch Individuen aus Karlsruhe.

Population	**Anzahl genotypisierter Individuen**	**Verteilung der Haplotypen in den Populationen (Anzahl Individuen)**				
		HT1	**HT1***	**HT2**	**HT2***	**HT3**
Altenteil, SH	70	42 (60,0%)	1 (1,4%)	26 (37,1%)	0 (0,0%)	1 (1,4%)
Treia, SH*	33	22 (66,7%)	6 (18,2%)	4 (12,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Tümlauer Koog, SH	54	30 (55,6%)	4 (7,4%)	19 (35,2%)	0 (0,0%)	1 (1,9%)
Pratjau, SH	12	6 (50,0%)	4 (33,3%)	2 (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Bad Segeberg, SH	21	2 (9,5%)	4 (19,0%)	13 (61,9%)	2 (9,5%)	0 (0,0%)
Kollmar, SH	32	22 (68,8%)	5 (15,6%)	4 (12,5%)	0 (0,0%)	1 (3,1%)
Wedel, SH	37	30 (81,1%)	0 (0,0%)	4 (10,8%)	0 (0,0%)	3 (8,1%)
Büchen, SH	11	3 (27,3%)	4 (36,4%)	3 (27,3%)	0 (0,0%)	1 (9,1%)
Barendorf, NI	32	19 (59,4%)	8 (25,0%)	3 (9,4%)	0 (0,0%)	2 (6,3%)
Pevestorf, NI	50	2 (4,0%)	23 (46,0%)	0 (0,0%)	4 (8,0%)	21 (42,0%)
Hahndorf, NI*	60	42 (70,0%)	7 (11,7%)	0 (0,0%)	4 (6,7%)	0 (0,0%)
Ilmenau, TH	11	0 (0,0%)	1 (9,1%)	0 (0,0%)	10 (90,9%)	0 (0,0%)
Bretten, BW*	75	18 (24,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	55 (73,3%)	0 (0,0%)
Freiburg, BW	33	33 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Σ	**531**	**271 (51,0%)**	**67 (12,6%)**	**78 (14,7%)**	**75 (14,2%)**	**30 (5,6%)**

insgesamt vier unterschiedlichen Haplotypen fand sich in den Populationen Tümlauer Koog und Kollmar; die Mehrzahl der Populationen wiesen drei unterschiedliche Haplotypen auf. In keiner der untersuchten Populationen fanden sich alle fünf Haplotypen (Abb. 28, Tab. 20). Die Analysen der Haplotyp-Frequenzen zwischen den Populationen auf der Grundlage der F_{ST}-Werte verdeutlicht die Populationsdifferenzierung (Tab. 22). Die Population Ilmenau weist im Vergleich mit den anderen Populationen vergleichsweise hohe F_{ST} -Werte auf, doch auch die Population aus Freiburg ist von einigen der anderen Populationen deutlich differenziert, was auf eine ausgeprägte Isolation dieser Populationen hinweist. Jedoch sind es nicht nur geographisch entfernte Populationen, die aufgrund ihrer Haplotyp-Frequenzen gegeneinander isoliert sind, sondern zum Teil auch vergleichsweise nah beieinanderliegende Populationen, die wenige Allele miteinander teilen, wie zum Beispiel der Vergleich Bretten - Freiburg zeigt. Insgesamt jedoch sind die F_{ST} -Werte als niedrig anzusehen, und es ist davon auszugehen, dass der Großteil der untersuchten Populationen nicht oder sehr wenig gegeneinander isoliert ist.

Der häufigste Haplotyp ist HT1. Er wurde bei insgesamt 271 Individuen (nur bei Weibchen) aus 13 Populationen gefunden (Tab. 23); umgerechnet auf die Gesamtanzahl genotypisierter Individuen entspricht dies einem prozentualen Anteil von 51,0%. Es zeigt sich jedoch, dass dieser Haplotyp in den einzelnen Populationen in sehr unterschiedlichen

Tab. 22 Paarweise F_{ST} -Werte der analysierten Populationen der Art *A. lythri*. Alt-Altenteil, N=70; Tre-Treia, N=33; Tüm-Tümlauer Koog, N=54; Pra-Pratjau, N=12; Seg-Bad Segeberg, N=21; Kol-Kollmar, N=32; Wed-Wedel, N=37; Bue-Büchen, N=11; Bar-Barendorf, N=32; Pev-Pevestorf, N=50; Hah-Hahndorf, N=60; Ilm-Ilmenau, N=11; Bre-Bretten, N=75; Fre-Freiburg, N=33. Die Population Bretten umfasst auch Individuen aus Karlsruhe.

	paarweise F_{ST} -Werte						
Population	**1 Alt**	**2 Tre**	**3 Tüm**	**4 Pra**	**5 Seg**	**6 Kol**	**7 Wed**
1 Altenteil	0,00000	-	-	-	-	-	-
2 Treia	0,06669	0,00000	-	-	-	-	-
3 Tümlauer Koog	-0,01097	0,04434	0,00000	-	-	-	-
4 Pratjau	0,08779	-0,00889	0,03682	0,00000	-	-	-
5 Bad Segeberg	0,23492	0,33044	0,18843	0,20430	0,00000	-	-
6 Kollmar	0,06092	-0,02865	0,04258	0,00617	0,34434	0,00000	-
7 Wedel	0,10018	0,04226	0,10559	0,17318	0,48265	0,02189	0,00000
8 Büchen	0,14719	0,11343	0,08262	-0,03860	0,07633	0,13023	0,31604
9 Barendorf	0,09388	-0,01709	0,05863	-0,03827	0,29504	-0,01356	0,08476
10 Pevestorf	0,42019	0,35559	0,36534	0,22994	0,32801	0,36420	0,47967
11 Hahndorf	0,13103	0,00574	0,11383	0,06362	0,41111	0,00307	0,03743
12 Ilmenau	**0,57813**	**0,58429**	**0,54113**	**0,55501**	**0,52437**	**0,59933**	**0,71057**
13 Bretten	0,42070	0,40522	0,39453	0,38061	0,42717	0,41204	0,47706
14 Freiburg	0,28917	0,21591	0,30264	**0,52000**	**0,73023**	0,19994	0,11071

Fortsetzung

	8 Bue	**9 Bar**	**10 Pev**	**11 Hah**	**12 Ilm**	**13 Bre**	**14 Fre**
8 Büchen	0,00000	-	-	-	-	-	-
9 Barendorf	0,05273	0,00000	-	-	-	-	-
10 Pevestorf	0,12319	0,27614	0,00000	-	-	-	-
11 Hahndorf	0,20489	0,02314	0,39335	0,00000	-	-	
12 Ilmenau	**0,50171**	**0,54091**	0,46449	**0,56199**	0,00000	-	-
13 Bretten	0,37685	0,38434	0,41895	0,37793	0,07726	0,00000	-
14 Freiburg	**0,65955**	0,27665	**0,63499**	0,13118	**0,95481**	**0,60385**	0,00000

Häufigkeiten vertreten ist (Abb. 28). So stellt er in neun Populationen die vorherrschende Form mit einem Anteil von 50 bis 100%, ist in den restlichen drei Populationen jedoch nur in geringem Maße (4 bis 24%) oder gar nicht vorhanden (Population Ilmenau). Der von HT1 abgeleitete Haplotyp HT1* fand sich bei insgesamt 67 Individuen (12,6%) aus elf Populationen (ebenfalls ausschließlich bei Weibchen). Dieser Haplotyp konnte in Populationen aus Süddeutschland nicht nachgewiesen werden und ist im östlichen Schleswig-Holstein (jedoch nicht auf der Insel Fehmarn) und im östlichen Niedersachsen besonders häufig (33 bis 46%).

Sowohl HT2 als auch HT2* wurden sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Individuen nachgewiesen und waren dabei etwa gleich häufig (Tab. 23). HT2 fand sich bei 78 Individuen (14,7%) und HT2* bei insgesamt 75 Individuen (14,2%). HT2 wurde ausschließlich in Norddeutschland (südlich bis Barendorf) nachgewiesen. Seine prozentualen Anteile in den Populationen (sofern vorhanden) lagen zwischen 9,4 und 37%. Mit einer Ausnahme (Population Bad Segeberg) konnte HT2* ausschließlich in solchen Populationen nachgewiesen werden, in denen HT2 nicht gefunden wurde (Tab. 21); zudem

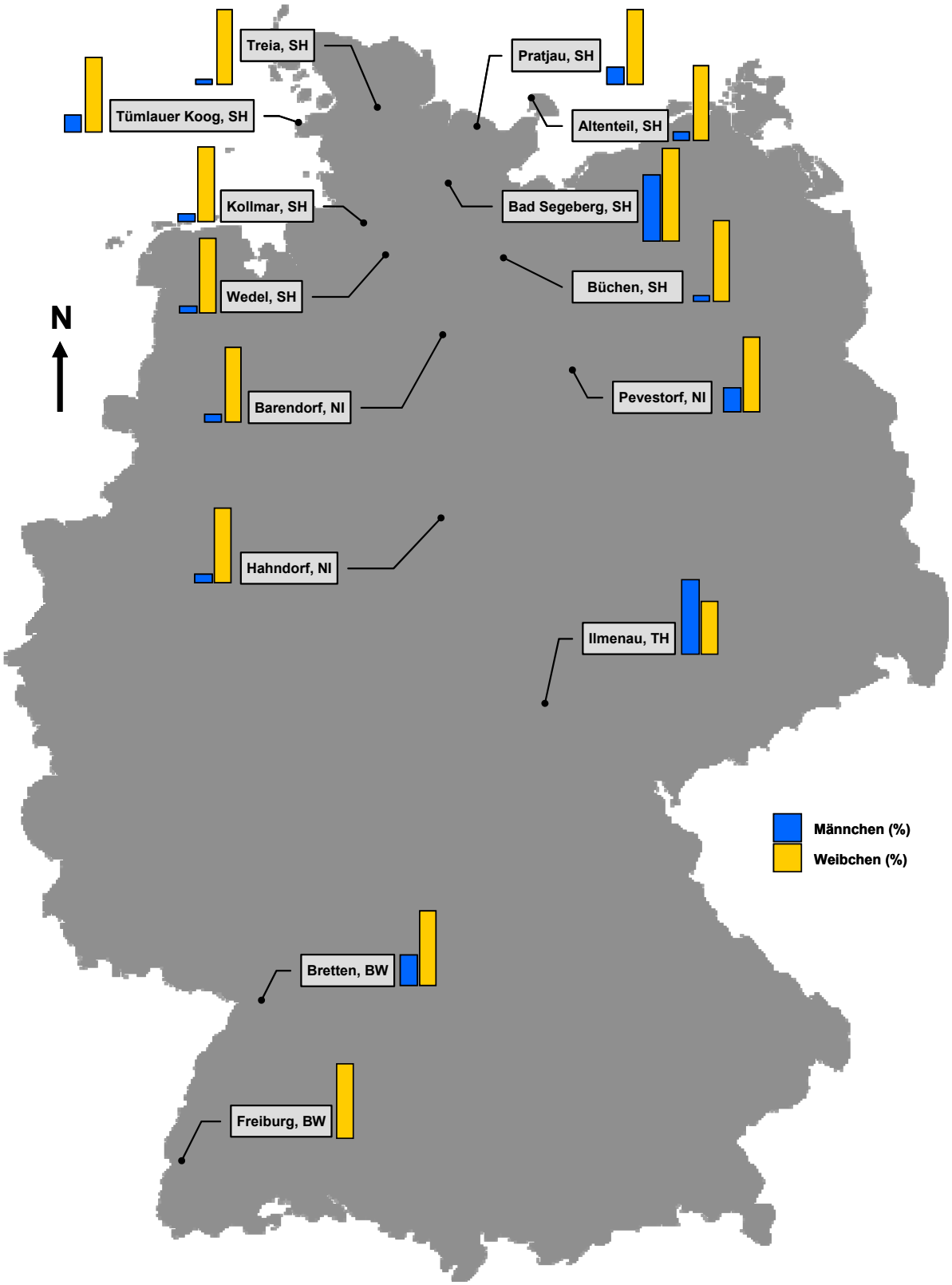

Abb. 27 Darstellung der relativen Anteile (%) männlicher (blaue Balken) und weiblicher Individuen (gelbe Balken) für jede der zwischen 2006 und 2010 analysierten 14 Populationen der Art *A. lythri*. BW-Baden-Württemberg; NI-Niedersachsen; SH-Schleswig-Holstein, TH-Thüringen. Altenteil: N=83; Treia: N=36; Tümlauer Koog: N=89; Pratjau: N=16; Bad Segeberg: N=36; Kollmar: N=33; Wedel: N=37; Büchen (inkl. Karlsruhe): N=63; Barendorf: N=32; Pevestorf: N=79; Hahndorf: N=61; Ilmenau: N=11; Bretten: N=89; Freiburg: N=33.

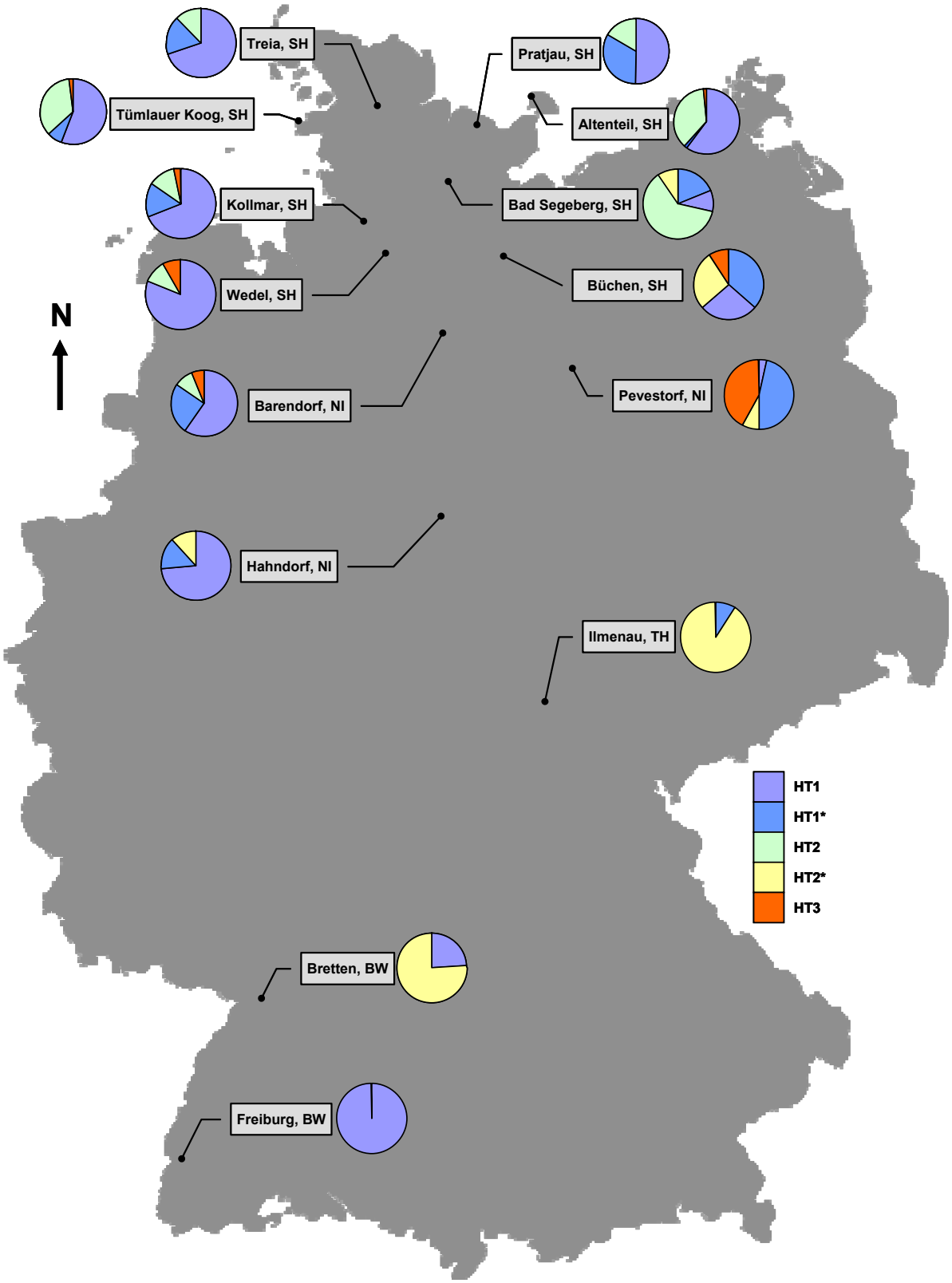

Abb. 28 Darstellung der relativen Anteile der fünf mtDNA-Haplotypen in den 14 untersuchten Populationen der Art *A. lythri*. BW-Baden-Württemberg; NI-Niedersachsen; SH-Schleswig-Holstein, TH-Thüringen. Altenteil: N=70; Treia: N=33; Tümlauer Koog: N=54; Pratjau: N=12; Bad Segeberg: N=36; Kollmar: N=32; Wedel: N=37; Büchen: N=63; Barendorf: N=32; Pevestorf: N=50; Hahndorf: N=60; Ilmenau: N=11; Bretten (inkl. Karlsruhe): N=75; Freiburg: N=33.

fällt das Fehlen dieses Haplotyps im nordwestlichen Bereich des Untersuchungsgebietes auf (Abb. 28).

HT3 wurde bei insgesamt 30 Individuen (5,6%) beiderlei Geschlechts nachgewiesen (Tab. 21, Tab. 23) und ist somit weitaus seltener als alle anderen Haplotypen. Mit einem Auftreten bei 42% der untersuchten Tiere in der Population aus Pevestorf weist HT3 dort seine umfangreichste Verbreitung auf und wurde ansonsten nur in fünf weiteren Populationen bei höchstens 8,1% der Individuen nachgewiesen. Südlich von Pevestorf wurde HT3 nicht nachgewiesen, und nach Norden nimmt seine Verbreitung deutlich ab.

3.2.3. Der Zusammenhang zwischen Haplotyp und Geschlecht

Mit der geographischen Analyse ließ sich für alle 14 Populationen der Art *A. lythri* das Fehlen männlicher Individuen der Haplotypen HT1 beziehungsweise HT1* nachweisen (Tab. 23, Abb. 31). Männliche *A. lythri* wiesen entweder Haplotyp HT2, HT2* oder HT3 auf. Weibchen dagegen fanden sich in allen fünf Kategorien, wiesen also entweder HT1, HT1*, HT2, HT2* oder HT3 auf.

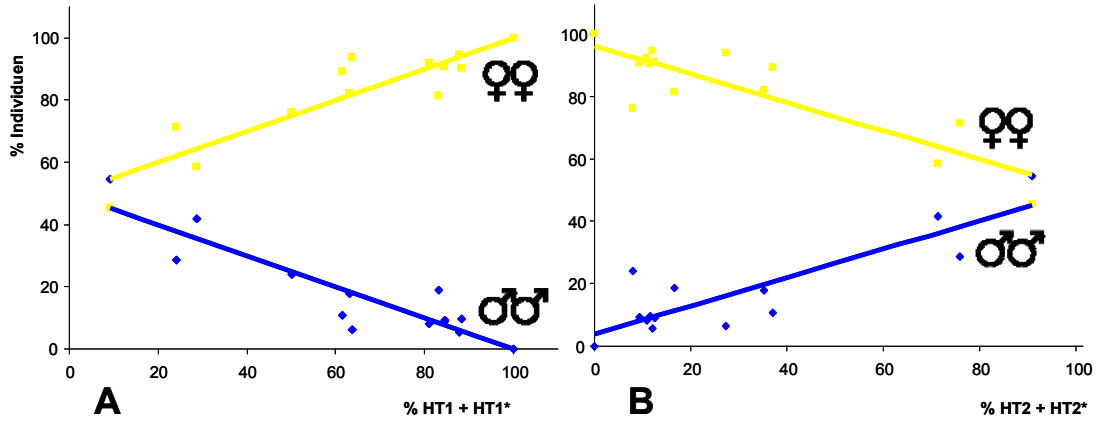

Abb. 29 Der Zusammenhang zwischen prozentualem Anteil Männchen beziehungsweise Weibchen und dem Anteil Individuen des mtDNA-Haplotyps HT1 (inkl. HT1*) (**A**) beziehungsweise HT2 (inkl. HT2*) (**B**) in einer Population. Darstellung ermittelt anhand aller 14 in der geographischen Analyse enthaltenen Populationen.

Die populationsübergreifende graphische Darstellung des prozentualen Anteils weiblicher beziehungsweise männlicher Individuen in Abhängigkeit vom jeweiligen Anteil der Haplotypen lässt einen klaren Zusammenhang zwischen den beiden Faktoren erkennen (Abb. 29). Für HT1/HT1* (Abb. 29 A) gilt eine signifikante negative Korrelation: Je häufiger diese beiden Haplotypen in einer Population auftreten, desto geringer ist der Anteil Männchen und desto höher ist der Anteil weiblicher Tiere in der jeweiligen Population (r = -0,89975). Für HT2/HT2* liegen die Verhältnisse genau umgekehrt (Abb. 29 B): Je höher der

Anteil dieser Haplotypen, desto höher der Anteil männlicher Individuen in der Population (r = 0,85798).

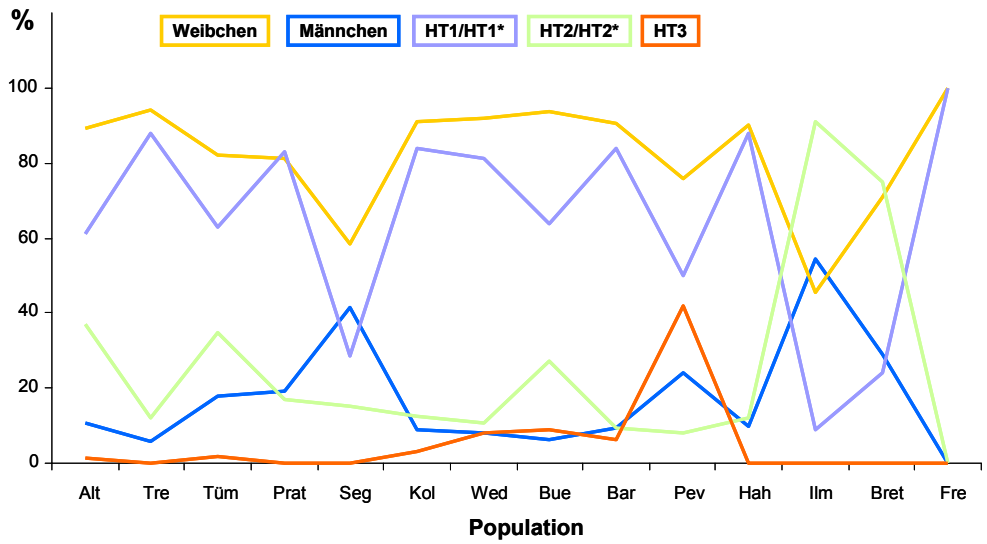

Abb. 30 Zusammenfassende Darstellung der Daten zu prozentualen Anteilen von Männchen, Weibchen, HT1 (inkl. HT1*), HT2 (inkl. HT2*) sowie HT3, populationsübergreifend sortiert von Nord nach Süd (X-Achse), mit Angabe der Anteile männlicher und weiblicher Individuen an der Population sowie der mtDNA-Haplotypen (Y-Achse). Alt-Altenteil, N=70; Tre-Treia, N=33; Tüm-Tümlauer Koog, N=54; Pra-Pratjau, N=12; Seg-Bad Segeberg, N=21; Kol-Kollmar, N=32; Wed-Wedel, N=37; Bue-Büchen, N=11; Bar-Barendorf, N=32; Pev-Pevestorf, N=50; Hah-Hahndorf, N=60; Ilm-Ilmenau, N=11; Bre-Bretten, N=75; Fre-Freiburg, N=33.

Trägt man alle Daten (Männchen, Weibchen und alle Haplotypen, Tab. 23) in einem Diagramm auf (Abb. 30), wird deutlich, wie stark die prozentualen Anteile männlicher beziehungsweise weiblicher Tiere den jeweiligen Anteilen der Häufigkeit der Haplotypen HT1 (inklusive HT1*) beziehungsweise HT2 (inklusive HT2*) folgen beziehungsweise entgegenlaufen. Während der (populationsübergreifende) Kurvenverlauf für die Weibchen dem Verlauf des Haplotyps HT1/HT1* folgt, folgt die Anzahl männlicher Tiere dem Verlauf des prozentualen Anteils der Haplotypen HT2/HT2*. Lediglich der erheblich seltenere HT3 zeigt keine durchgehende Korrelation; einzig für die Population Pevestorf lässt sich ein positiver Zusammenhang zwischen dem Anteil männlicher Individuen und der Häufigkeit von HT3 erkennen.

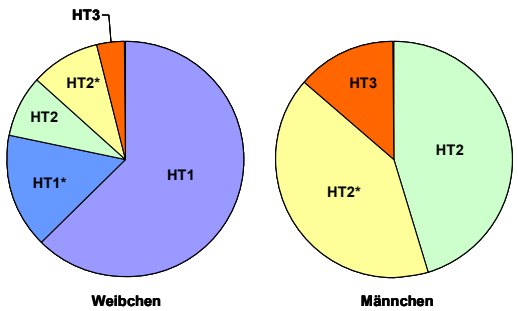

Abb. 31 Bei Weibchen beziehungsweise Männchen der Art *A. lythri* auftretende mitochondrielle Haplotypen. Daten ermittelt anhand der 14 untersuchten Populationen.

Die Haplotypen HT2 beziehungsweise HT2* stellen in den Populationen zu einem bestimmten Anteil Männchen eine annähernd gleiche Anzahl Weibchen (Abb. 31, Abb. 32),

wie man es erwarten kann, wenn Weibchen dieser Haplotypen etwa 50% männliche Nachkommen hervorbringen. Gleiches gilt für HT3, doch war dieser Haplotyp in den meisten Populationen selten oder fehlte, so dass lediglich für die Population Pevestorf festgestellt werden kann, dass die gefundenen Männchen und Weibchen zu jeweils etwa 50% von diesem Haplotyp gestellt wurden. Für HT2 fehlten in manchen Populationen Individuen des jeweils anderen Geschlechts (Abb. 32): So fanden sich in Pratjau, Büchen und Barendorf zwar Männchen, jedoch keine Weibchen mit dem Haplotyp HT2. Entsprechend wiesen im Falle von HT2* die Populationen Bad Segeberg und Pevestorf zwar Männchen, aber keine Weibchen dieses Haplotyps auf. Lediglich in einem Fall traten Männchen der Haplotypen HT2 und HT2* gemeinsam in einer Population auf (Population Bad Segeberg), wohingegen Männchen der Haplotypen HT2 oder HT2* und HT3 häufiger nebeneinander gefunden wurden.

Tab. 23 Geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung in Populationen der Art *A. lythri*: Verteilung der fünf Haplotypen bei den genotypisierten Individuen unter Berücksichtigung des Geschlechts des jeweiligen Individuums. Untere Zeile: Angabe über die Summe der insgesamt genotypisierten Individuen sowie die Gesamtanzahlen für jeden Haplotyp. *Hierher insgesamt sieben weitere mtDNA-Varianten (in der Tabelle nicht aufgeführt).

Population	**Weibchen**					**Männchen**				
	HT1	**HT1***	**HT2**	**HT2***	**HT3**	**HT1**	**HT1***	**HT2**	**HT2***	**HT3**
Altenteil, SH	42	1	19	0	0	0	0	7	0	1
Treia, SH*	22	6	2	0	0	0	0	2	0	0
Tüml. Koog, SH	30	4	7	0	1	0	0	12	0	0
Pratjau, SH	6	4	0	0	0	0	0	2	0	0
Bad Segeberg, SH	2	4	5	0	0	0	0	8	2	0
Kollmar, SH	22	5	1	0	1	0	0	3	0	0
Wedel, SH	30	0	2	0	2	0	0	2	0	1
Büchen, SH	3	4	0	0	0	0	0	3	0	1
Barendorf, NI	19	8	0	0	2	0	0	3	0	0
Pevestorf, NI	2	23	0	0	11	0	0	0	4	10
Hahndorf, NI*	42	7	0	1	0	0	0	0	3	0
Ilmenau, TH	0	1	0	4	0	0	0	0	6	0
Bretten, BW*	18	0	0	35	0	0	0	0	20	0
Freiburg, BW	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Σ	**271**	**67**	**36**	**40**	**17**	**0**	**0**	**42**	**35**	**13**

Zusammenfassend betrachtet ist bezüglich der Geschlechterverteilung im Zusammenhang mit der Verteilung der mtDNA-Haplotypen von der allgemeingültigen Regel auszugehen, dass Weibchen der Haplotypen HT1 und HT1* ausschließlich weibliche Nachkommen hervorbringen, Weibchen der Haplotypen HT2, HT2* und HT3 dagegen in der Lage sind, sowohl weibliche als auch männliche Nachkommen zu erzeugen. Dieser indirekte Nachweis eines Zusammenhanges zwischen mitochondriellem Haplotyp und dem verschobenen Geschlechterverhältnis wird mit dem direkten Nachweis in Abschnitt 3.3.3 weiter verfolgt und präzisiert.

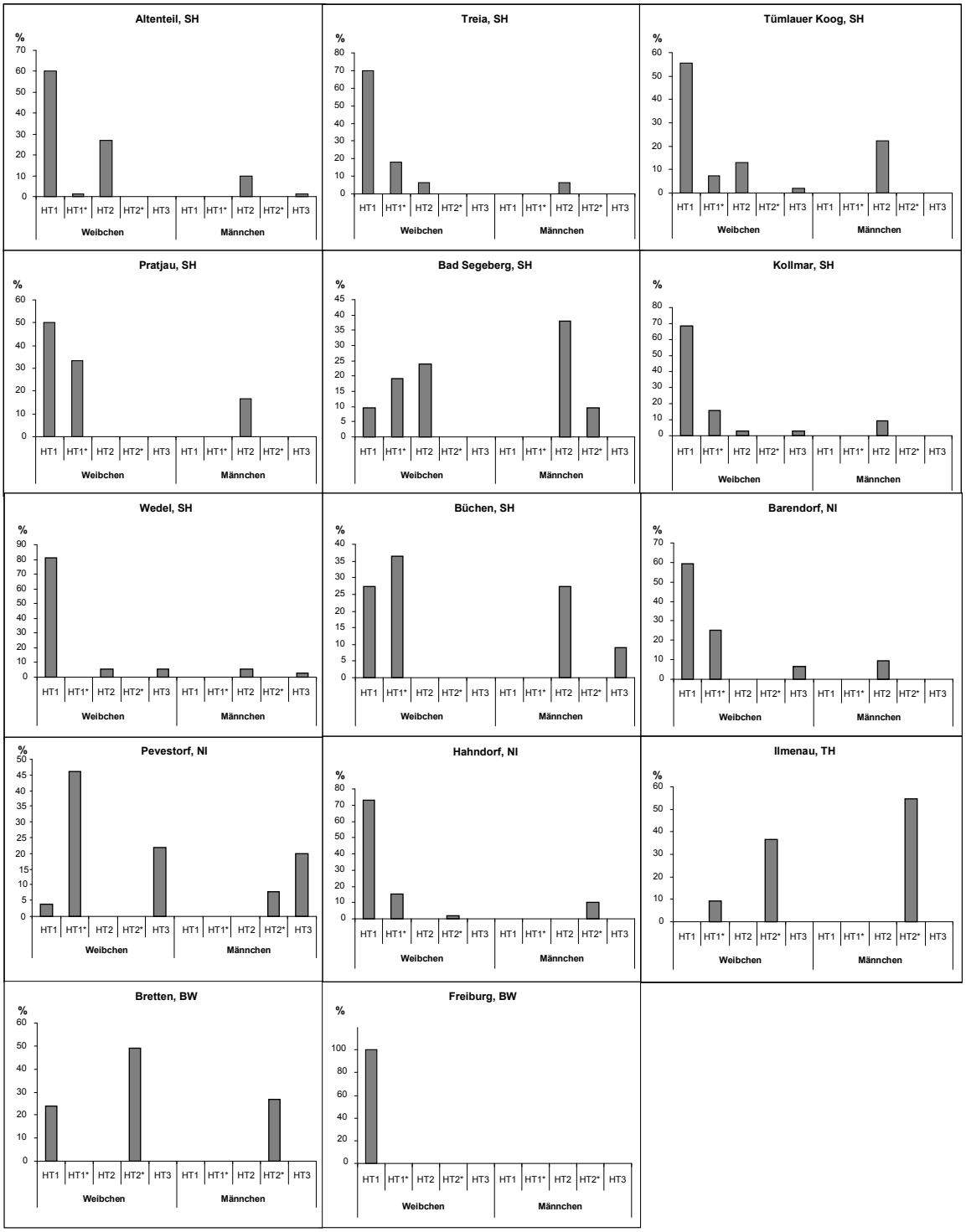

Abb. 32 Darstellung der prozentualen Anteile der mitochondriellen Haplotypen (HT1, HT1*, HT2, HT2*, HT3) bei den 14 untersuchten Populationen der Art *A. lythri*; Angabe jeweils für Weibchen beziehungsweise Männchen, berechnet über die Gesamtzahl beider Geschlechter. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Individuenzahlen für jeden Haplotyp sind die Prozent-Skalen an der Y-Achse individuell verschieden.

3.2.4. Haplotyp-Netzwerk und Nachweis weiterer mtDNA-Varianten

Das mit Hilfe des Programms Network 4.5.1.6. erstellte, auf dem Vorhandensein beziehungsweise Fehlen der Schnittstellen der drei in der RFLP-Analyse eingesetzten Enzyme basierende Netzwerk der mtDNA-Haplotypen der Art *A. lythri* vermittelt anschaulich die unterschiedlichen Häufigkeiten, mit denen die fünf wesentlichen Haplotypen (HT1, HT1*, HT2, HT2* und HT3) in den analysierten Populationen der Art *A. lythri* auftreten, sowie die Beziehungen der Varianten untereinander, basierend auf ihrer Ähnlichkeit zueinander (Abb. 33, Tab. 24). Die Frequenzen der einzelnen Haplotypen sind hierbei graphisch im richtigen Verhältnis zueinander dargestellt (nach Anzahl der Individuen mit dem jeweiligen Haplotyp). Bei dieser Darstellung wird deutlich, dass aufgrund der Restriktionsanalyse sieben weitere Formen der mtDNA unterschieden werden können, die bei insgesamt 14 Individuen aus den Populationen aus Bretten (Baden-Württemberg), Hahndorf (Niedersachsen) und Treia (Schleswig-Holstein) auftraten (zum Teil nur bei Einzelindividuen nachgewiesen). Diese Formen wurden in den bisherigen Analysen (Abschnitte 3.2.2. und 3.2.3) der Übersichtlichkeit halber außer Acht gelassen, sollen nun jedoch gesondert betrachtet werden. Ihre Frequenz ist im Vergleich zu den häufigen Haplotypen HT1, HT1*, HT2, HT2* und HT3 sehr gering. Die Varianten wurden nach ihrem Auftreten in den Populationen benannt (Abb. 33, Tab. 24) und durchnummeriert (BRE1 und BRE2, HAH1 bis HAH4 beziehungsweise TRE1). Die Formen BRE1 und BRE2 wurden bei jeweils drei Individuen nachgewiesen (0,6% aller 531 analysierten Individuen); die Varianten HAH1, HAH2 und TRE1 fanden sich bei jeweils einem Individuum (0,2% aller Individuen). HAH3 und HAH4 wurden bei zwei beziehungsweise drei Individuen nachgewiesen (0,3% beziehungsweise 0,6% aller Individuen). Das Netzwerk zeigt deutlich, dass die meisten Varianten sich anhand der untersuchten Schnittstellen stark von den fünf verbreiteten Haplotypen unterscheiden. Lediglich die Varianten BRE1 und BRE2 weisen nahe

Tab. 24 Schnittstellen aller bei den analysierten 14 Populationen der Art *A. lythri* nachgewiesenen mtDNA-Varianten, aufgelistet nach den drei eingesetzten Enzymen BamHI, HaeIII und HinfI. 0: Schnittstelle fehlt; 1: Schnittstelle vorhanden. Bezogen auf das analysierte Fragment von *COI* (1381bp).

	BamHI	**HaeIII**			**HinfI**			
	511	**98**	**407**	**500**	**135**	**783**	**1020**	**1206**
HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
BRE1	0	1	0	0	1	0	0	1
BRE2	0	1	0	0	1	0	1	0
HAH1	0	1	1	0	1	1	1	1
HAH2	0	1	0	1	1	1	1	1
HAH3	0	1	0	1	1	1	0	0
HAH4	1	1	1	0	1	0	1	0
TRE1	0	1	0	0	1	1	0	0

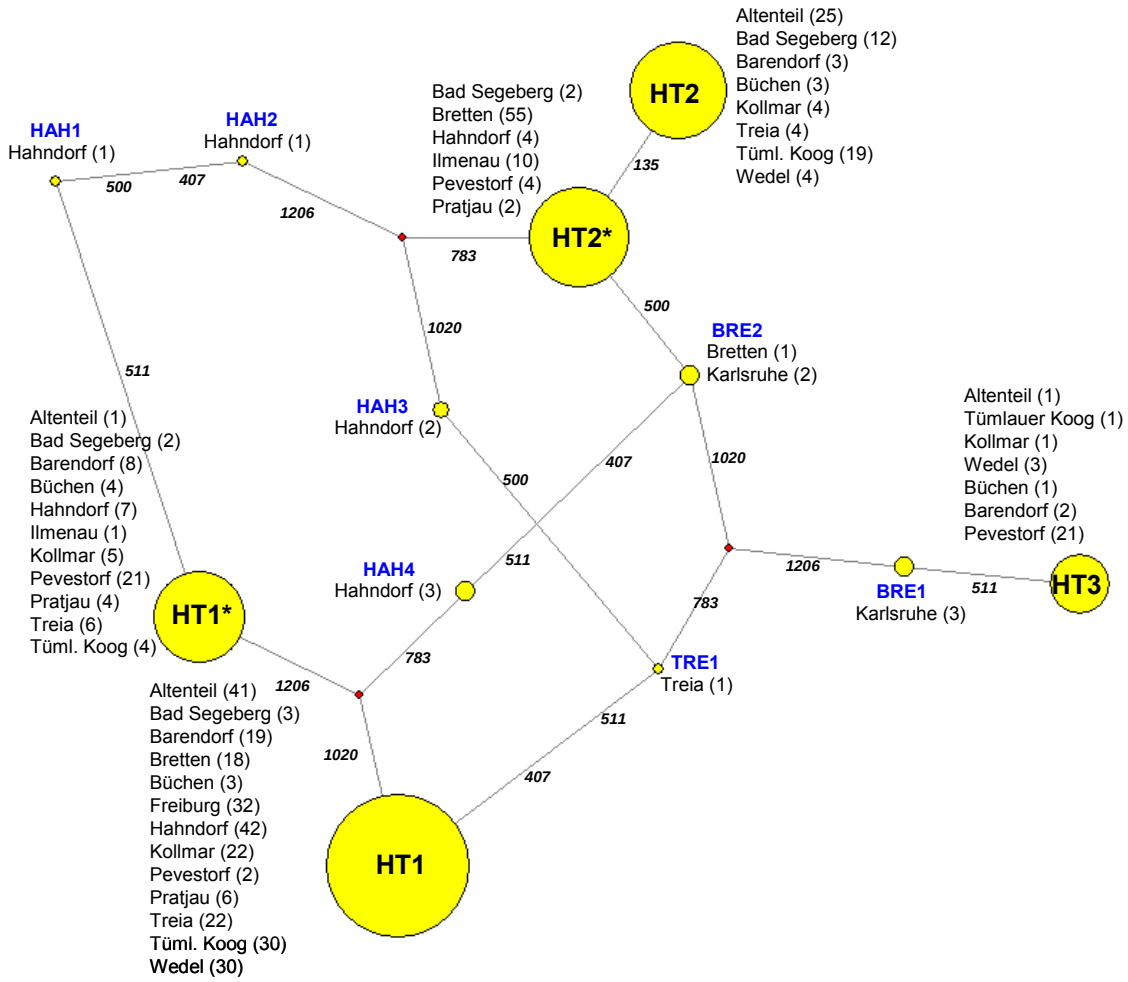

Abb. 33 Median Joining-Netzwerk der in den untersuchten 14 Populationen der Art *A. lythri* nachgewiesenen mtDNA-*COI*-Haplotypen (gelbe Kreise); Berechnung mittels Network 4.5.1.6. Größe der Kreise proportional zur Anzahl der Individuen. Für jeden Haplotyp sind die Populationen und die Anzahl der Individuen (in Klammern) angegeben. In blau: Benennung von sechs zusätzlichen mtDNA-Varianten, die in den Populationen Bretten, Hahndorf und Treia gefunden wurden. Die roten Kreise symbolisieren nicht aufgefundene Haplotypen; die Zahlen an den Verbindungen repräsentieren die Schnittstellen, auf deren Analyse der Datensatz beruht.

Verwandtschaften zu den Haplotypen HT2* beziehungsweise HT3 auf: BRE1 unterscheidet sich von HT3 lediglich durch das Fehlen einer Schnittstelle; BRE2 weicht von HT2* durch das Fehlen einer anderen Schnittstelle ab (Abb. 33).

Bei fünf Exemplaren der Individuen mit den mtDNA-Varianten BRE1 beziehungsweise BRE2 handelt es sich um die fünf in Karlsruhe (Schloßpark) gesammelten Individuen (Tab. 25). Das sechste Tier (Variante BRE2, Individuum A lyt 41) stammt aus Bretten (Entfernung Bretten - Karlsruhe: etwa 25km). Alle sieben Individuen, bei denen die Varianten HAH1 - 4 nachgewiesen wurden, stammen aus der Population Hahndorf.

Tab. 25 Herkunft und Anzahl der Individuen, die die mtDNA-Varianten BRE1 und BRE2 aufwiesen. *sofern in der phylogenetischen Analyse vertreten.

mtDNA	Code*	Herkunft
BRE1	A lyt 44	Karlsruhe, BW
	-	Karlsruhe, BW
	A lyt 45	Karlsruhe, BW
BRE2	A lyt 41	Bretten, BW
	A lyt 43	Karlsruhe, BW
	-	Karlsruhe, BW

Genau wie bei den häufigen Haplotypen HT1, HT1*, HT2, HT2* und HT3 ist auch bei diesen zusätzlichen Varianten BRE1, BRE2, HAH1-4 und TRE1 die Geschlechterverteilung auffällig: Die drei Individuen des Typs HAH4 waren männlich (drei von insgesamt sechs Männchen aus der Population Hahndorf), während die Individuen aller übrigen Varianten weiblich waren. Aufgrund der relativ geringen Stichprobengröße (insgesamt 14 Individuen) kann man hier jedoch nicht mit Sicherheit von einer eindeutigen Datenlage ausgehen.

3.2.5. Auflösung von "HT2" auf der Grundlage der Restriktionspolymorphismen

Die Heterogenität der Gruppe der Individuen der Art *A. lythri*, die den Haplotyp HT2 aufweisen, war anhand der phylogenetischen Analyse bereits zu erkennen (Abb. 13). Diese Gruppe umfasst auch insgesamt vier Individuen, für die im Rahmen der geographischen Analyse der Haplotypenverteilung eine Restriktionsanalyse durchgeführt wurde; für diese Individuen waren somit die tatsächlichen mtDNA-Sequenzen vorhanden (A lyt 44 und A lyt 45, Haplotyp BRE1, sowie A lyt 41 und A lyt 43, Haplotyp BRE2).

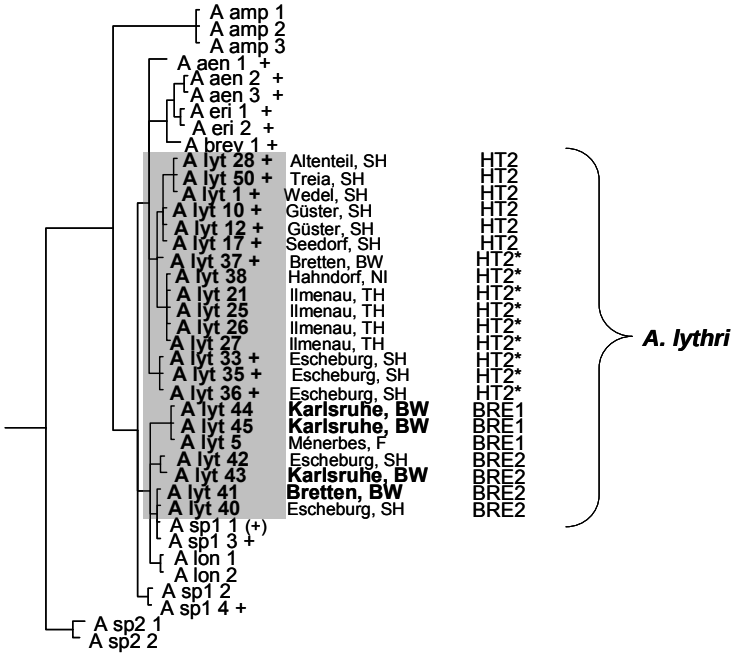

Abb. 34 Überblick über die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Haplogruppe "HT2" (*A. lythri*). Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus der Phylogenie der Gattung *Altica* (Abb. 13). Grau hinterlegt: *A. lythri* der Haplogruppe HT2. Fett gedruckt: Individuen, für die der Haplotyp zusätzlich mittels Restriktionsanalyse determiniert wurde. Anhand dieser vier Individuen erfolgte die Zuordnung zu den Varianten BRE1 beziehungsweise BRE2.

Der Vergleich der mittels RFLP erhaltenen Daten mit den Sequenzdaten aus der phylogenetischen Analyse verdeutlicht, dass weitere Individuen der Art *A. lythri* identifiziert werden können, die jeweils dasselbe Schnittmuster aufwiesen (Tab. 26); dies wurde unter Zuhilfenahme der mtDNA-Sequenz der entsprechenden Individuen gezeigt, indem das Vorhandensein beziehungsweise Fehlen der Schnittstellen der verwendeten Enzyme in der Sequenz

Tab. 26 Auflösung der Haplogruppe "HT2" (vgl. phylogenetische Analyse) mit Hilfe der Restriktionsstellen der Enzyme BamHI, HaeIII und HinfI in insgesamt vier Haplotypen. Die fett beziehungsweise kursiv gedruckten Individuen bilden in der phylogenetischen Analyse auffällige Gruppierungen auf der Grundlage ihrer *COI/COII*-Sequenzen. Variable Schnittstellen der Enzyme fett gedruckt. Zur Verdeutlichung vergleiche auch Abb. 34.

				Schnittstellen							
HT	**Code**		**Herkunft**	**BamHI**	**HaeIII**			**HinfI**			
				511	**98**	**407**	**500**	**135**	**783**	**1020**	**1206**
HT2	**A lyt 28**	♂	Altenteil, SH	0	1	0	**1**	**0**	0	**1**	**0**
HT2	**A lyt 50**	♂	Treia, SH	0	1	0	**1**	**0**	0	**1**	**0**
HT2	**A lyt 1**	♂	Wedel, SH	0	1	0	**1**	**0**	0	**1**	**0**
HT2	A lyt 10	♀	Güster, SH	0	1	0	**1**	**0**	0	**1**	**0**
HT2	A lyt 12	♂	Güster, SH	0	1	0	**1**	**0**	0	**1**	**0**
HT2	A lyt 17	♂	Seedorf, SH	0	1	0	**1**	**0**	0	**1**	**0**
HT2*	A lyt 37	♀	Bretten, BW	0	1	0	**1**	**1**	0	**1**	**0**
HT2*	**A lyt 38**	♀	Hahndorf, NI	0	1	0	**1**	**1**	0	**1**	**0**
HT2*	**A lyt 21**	♀	Ilmenau, TH	0	1	0	**1**	**1**	0	**1**	**0**
HT2*	**A lyt 25**	♀	Ilmenau, TH	0	1	0	**1**	**1**	0	**1**	**0**
HT2*	**A lyt 26**	♂	Ilmenau, TH	0	1	0	**1**	**1**	0	**1**	**0**
HT2*	**A lyt 27**	♂	Ilmenau, TH	0	1	0	**1**	**1**	0	**1**	**0**
HT2*	*A lyt 33*	♂	Escheburg, SH	0	1	0	**1**	**1**	0	**1**	**0**
HT2*	*A lyt 35*	♀	Escheburg, SH	0	1	0	**1**	**1**	0	**1**	**0**
HT2*	*A lyt 36*	♀	Escheburg, SH	0	1	0	**1**	**1**	0	**1**	**0**
BRE1	**A lyt 44**	♀	Karlsruhe, BW	0	1	0	**0**	**1**	0	**0**	**1**
BRE1	**A lyt 45**	♀	Karlsruhe, BW	0	1	0	**0**	**1**	0	**0**	**1**
BRE1	**A lyt 5**	♀	Ménerbes, F	0	1	0	**0**	**1**	0	**0**	**1**
BRE2	*A lyt 42*	♀	Escheburg, SH	0	1	0	**0**	**1**	0	**1**	**1**
BRE2	*A lyt 43*	♀	Karlsruhe, BW	0	1	0	**0**	**1**	0	**1**	**1**
BRE2	**A lyt 41**	♀	Bretten, BW	0	1	0	**0**	**1**	0	**1**	**1**
BRE2	**A lyt 40**	♀	Escheburg, SH	0	1	0	**0**	**1**	0	**1**	**1**

(theoretisch) unter Verwendung des Programms Sequencher überprüft wurde (Tab. 26). Es fanden sich ein weiteres Individuum (A lyt 5, aus Frankreich) der Variante BRE1 sowie zwei weitere Individuen (A lyt 40 und A lyt 42, beide aus Escheburg, Schleswig-Holstein) der Variante BRE2. Es muss jedoch betont werden, dass zwar die Gruppierung BRE1, nicht aber die Gruppierung BRE2 auf der Grundlage der Nukleotidsequenzen in der phylogenetischen Analyse jeweils eine eigene Gruppierung bilden (Abb. 34). Als eigentlicher Haplotyp HT2 lässt sich dieser klar von den anderen Varianten (HT2*, BRE1, BRE2) abgrenzen; wie bereits erwähnt, konnte dieser Haplotyp ausschließlich im Norden des Untersuchungsgebietes nachgewiesen werden, während HT2* und die Variante BRE2 sowohl in Nord- als auch in Süddeutschland gefunden wurden. HT2 und HT2* zusammen bilden eine mehr oder weniger geschlossene Gruppierung, während die Varianten BRE1 und BRE2 mehr Ähnlichkeiten mit der mtDNA der Arten *A.* sp. 1 und *A. longicollis* aufweisen (Abb. 34). Überraschend ist die Verteilung von Männchen und Weibchen: Während Tiere der Haplotypen HT2 und HT2* jeweils beide Geschlechter repräsentieren, sind alle Individuen der Varianten BRE1 und BRE2 weiblich (Tab. 26).

3.3. Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität

Im Zusammenhang mit dem Auftreten unterschiedlicher *Wolbachia*-Infektionstypen innerhalb von Populationen der Art *A. lythri* ist die Frage nach dem Auftreten cytoplasmatischer Inkompatibilität und somit reproduktiver Isolation innerhalb einer Art von entscheidender Bedeutung. Mit Hilfe systematischer Paarungsexperimente sollte diese Möglichkeit überprüft werden.

3.3.1. Analyse von mtDNA und *Wolbachia*-Infektion der Muttertiere

Die Tiere für die Gewinnung virgineller Tiere für die Verpaarungsexperimente umfassten 109 weibliche Individuen, die an vier unterschiedlichen Tagen der Monate April, Mai und Juni im Jahre 2006 aus der Population in Wedel (Schleswig-Holstein) entnommen wurden. Bei allen Tieren handelte es sich nach dem Ergebnis der nach Abschluss der Nachzucht im Labor ergangenen Genitalpräparation um Vertreter der Art *A. lythri*. Insgesamt 73 Weibchen brachten jeweils eine große Bandbreite unterschiedlicher Nachkommenzahlen hervor (Tab. 28). Von insgesamt sieben Weibchen wurden männliche Nachkommen erhalten. Die ermittelten Zahlen beziehen sich nur auf die Tiere, die die Geschlechtsreife erreichten. Von den 73 Weibchen wurden insgesamt 2974 adulte Nachkommen erhalten. Von diesen waren 2827 weiblichen und 147 männlichen Geschlechts; der prozentuale Anteil männlicher Individuen betrug also 4,9% (aus dem Freiland dokumentiert: 8,1%, vergleiche Tab. 19).

Insgesamt 36 Weibchen erwiesen sich als nicht reproduktionsfähig, da sich die von ihnen gelegten Eier nicht entwickelten. Teilt man alle 109 Tiere nach dem Zeitpunkt der Entnahme aus dem Feld beziehungsweise nach dem Zeitpunkt der Separierung in Gruppen ein, ergibt sich eine deutliche Staffelung der prozentualen Anteile reproduktionsfähiger Weibchen nach dem Zeitpunkt der Vereinzelung (Tab. 27). Es ist also wahrscheinlich, dass diejenigen Weibchen, deren Eier nicht entwicklungsfähig waren, unverpaart beziehungsweise unbefruchtet waren und dass eine längere Verweildauer im Freiland den

Tab. 27 Abhängigkeit der Reproduktionsfähigkeit im Feld gesammelter Weibchen der Art *A. lythri* vom Sammel- bzw. Vereinzelungszeitraum. Spalte 1: Einteilung der 109 Weibchen in Gruppen. Spalte 2: Nummer der Weibchen. Spalte 3: Anzahl Weibchen in der jeweiligen Gruppe. Spalte 4: Sammeldatum. Spalte 5: Datum der Vereinzelung. Spalte 6: Anteil Weibchen mit entwicklungsfähigen Eiern = Nachkommen in Prozent.

Gruppe	Weibchen Nr.	N	gesammelt	vereinzelt	♀♀ mit Nachk.
I	1 – 39	39	15.IV.2006	21.IV.2006	48,7%
II	40 – 50	11	15.IV.2006	25.IV.2006	54,5%
III	51 – 70	20	15.IV.2006	29.IV.2006	60,0%
IV	71 – 90	20	09.V.2006	09.V.2006	95,0%
V	91 – 94	4	02.VI.2006	02.VI.2006	100%
VI	95 – 109	15	10.V.2006	10.V.2006	100%

Befruchtungserfolg steigert. Dies ist in der untersuchten Population sicher von besonderer Bedeutung, da männliche Individuen nur einen sehr geringen Anteil an der Population ausmachen. Die Weibchen aus den Gruppen I bis III (Tab. 27) waren bis zu ihrer Vereinzelung in Plastikbehältern gemeinsam mit einer geringen Anzahl Männchen untergebracht (zwei bis drei Männchen und etwa 40 Weibchen); hier lässt sich deutlich, in Abhängigkeit von der Verweildauer bis zur Vereinzelung der Weibchen, eine Zunahme des Befruchtungserfolges ablesen. Noch deutlicher wird die Zunahme des Reproduktionserfolges bei den Gruppen IV bis VI, die fast einen Monat später im Feld gesammelt wurden (Reproduktionserfolg 95 bis 100%, das heißt, 95% beziehungsweise 100% der gesammelten Weibchen legten entwicklungsfähige Eier).

3.3.1.1. Bestimmung der mtDNA-Haplotypen

Die RFLP-Analyse unter Verwendung dreier verschiedener Enzyme (BamHI, HaeIII, HinfI) zur Bestimmung der Haplotypen der 109 in Feld gesammelten Weibchen ergibt ein sehr ungleich verteiltes Verhältnis der Haplotypen zueinander: 100 Weibchen wiesen HT1 auf, sieben Weibchen trugen HT2, und bei einem Weibchen (♀68) wurde HT3 nachgewiesen (ein Haplotyp erwies sich als nicht eindeutig determinierbar, siehe unten). Sieben der 100 HT1-Individuen wiesen eine leicht abgewandelte Haplotyp-Variante auf, die sich von HT1 anhand der Anzahl der durch Verdau mit HinfI entstehenden Restriktionsfragmente unterscheiden lässt. Es handelt sich um den gleichen Typ mtDNA, der bereits in der phylogenetischen Analyse nachgewiesen werden konnte und wird daher auch hier als HT1* bezeichnet. HT2* wurde bei keinem der Weibchen nachgewiesen. In einem Fall (♀56) konnte der Haplotyp nicht zweifelsfrei bestimmt werden. Zwar weisen sowohl der Restriktionsverdau mittels BamH1 als auch mittels HaeIII für ♀56 auf HT1 hin, jedoch erwiesen sich die von HinfI erzeugten Ergebnisse nicht als eindeutig und konnten auch nach wiederholten Versuchen nicht verbessert werden. Daher wurden die oben genannten Zahlen für 108 Individuen berechnet. In allen anderen Fällen sind die mit jedem einzelnen Enzym erzielten Ergebnisse eindeutig und jedes der drei Enzyme zeigte übereinstimmende Ergebnisse.

Die ermittelten Zahlen resultieren in folgendem Ergebnis: 93 Weibchen (86,1%) tragen HT1; sieben Weibchen (6,4%) tragen HT1*; ebenfalls sieben Weibchen weisen HT2 auf (6,4%), und ein Weibchen trägt HT3 (0,9%). Folglich stellt HT1 innerhalb dieser Gruppe von 109 Tieren den bei weitem häufigsten Haplotyp dar und somit wahrscheinlich auch in

Tab. 28 Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung von *Wolbachia*-Infektionsstatus, mtDNA-Haplotyp sowie Anzahl und Geschlecht der Nachkommen der aus Wedel (Schleswig-Holstein) stammenden 109 *A. lythri*-Weibchen, deren Nachkommen für die gezielten Verpaarungsexperimente zum Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität verwendet wurden. Spalte 1: Nummer des Muttertiers. Spalte 2: *Wolbachia*-Infektionsstatus, bestimmt nach *wsp*-Restriktionsanalyse; wA1: *Wolbachia*-Stamm wA1, wA2: *Wolbachia*-Stamm wA2, wB: *Wolbachia*-Stamm wB, n.n.: nicht nachweisbar; +: vorhanden, aber nicht determinierbar. Spalte 3: mtDNA-Haplotyp. Spalte 4: Gesamtzahl der Nachkommen jedes Weibchens. Spalte 5 und 6: Anzahl weiblicher beziehungsweise männlicher Nachkommen. Hervorgehoben in Fettdruck: Muttertiere mit männlichen Nachkommen. Hervorgehoben in kursivem Druck: Weibchen ohne Nachkommen.

Muttertiere			**Nachkommen**		
♀ Nr.	**Wolb.**	**HT**	**gesamt**	**Anzahl ♀♀**	**Anzahl ♂♂**
1	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
2	WA1	HT1	78	78	0
3	WA1	HT1	3	3	0
4	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
5	WA1	HT1	29	29	0
6	WA1	HT1	69	69	0
7	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
8	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
9	*WA2*	*HT2*	*0*	*0*	*0*
10	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
11	WA1	HT1	1	1	0
12	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
13	*n.n.*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
14	WA1	HT1	92	92	0
15	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
16	*n.n.*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
17	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
18	*n.n.*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
19	n.n.	HT1	92	92	0
20	WA1	HT1	74	74	0
21	n.n.	HT1	61	61	0
22	WA1	HT1	15	15	0
23	WA1	HT1	66	66	0
24	WA1	HT1	39	39	0
25	**WA2**	**HT2**	**48**	**23**	**25**
26	WA1	HT1	75	75	0
27	n.n.	HT1	130	130	0
28	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
29	*n.n.*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
30	**WA2**	**HT2**	**99**	**50**	**49**
31	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
32	**n.n.**	**HT1**	**1**	**0**	**1**
33	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
34	WA1	HT1	83	83	0
35	n.n.	HT1	67	67	0
36	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
37	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
38	WA1	HT1	28	28	0
39	*WA1?*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
40	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
41	WA1	HT1	19	19	0
42	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
43	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
44	WA1	HT1	21	21	0
45	*n.n.*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
46	WA1	HT1	53	53	0
47	WA1	HT1	55	55	0
48	WA1	HT1	45	45	0
49	n.n.	HT1	31	31	0
50	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
51	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
52	WA1	HT1	36	36	0
53	n.n.	HT1*	66	66	0
54	WA1	HT1	47	47	0
55	+	HT1*	55	55	0
56	n.n.	HT1?	57	57	0
57	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
58	WA1?	HT1	16	16	0
59	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
60	WA1	HT1	37	37	0
61	n.n.	HT1	22	22	0
62	+	*HT1*	*0*	*0*	*0*
63	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
64	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
65	WA1	HT1	43	43	0
66	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
67	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
68	WB	HT3	6	6	0
69	n.n.	HT1	36	36	0
70	n.n.	HT1	35	35	0
71	WA1	HT1	32	32	0
72	n.n.	HT1	36	36	0
73	WA1	HT1	73	73	0
74	WA1	HT1	59	59	0
75	WA1	HT1	52	52	0
76	**WA2**	**HT2**	**39**	**16**	**23**
77	WA1	HT1	42	42	0
78	WA1	HT1	54	54	0
79	WA1	HT1	53	53	0
80	WA1	HT1	41	41	0
81	WA1	HT1	39	39	0
82	WA1	HT1	57	57	0
83	n.n.	HT1	47	47	0
84	WA1	HT1	47	47	0
85	n.n.	**HT2**	**67**	**34**	**33**
86	WA1	HT1	8	8	0
87	n.n.	HT1	13	13	0
88	WA1	HT1	19	19	0
89	WA1	HT1	24	24	0
90	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
91	n.n.	HT1*	38	38	0
92	WA1	HT1	37	37	0
93	WA1	HT1	62	62	0
94	WA1	HT1	53	53	0
95	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
96	**WA2**	**HT2**	**23**	**10**	**13**
97	WA1	HT1	25	25	0
98	*WA1*	*HT1*	*0*	*0*	*0*
99	WA1	HT1	2	2	0
100	WA1	HT1	9	9	0
101	n.n.	HT1*	4	4	0
102	n.n.	HT1*	3	3	0
103	**WA2**	**HT2**	**8**	**5**	**3**
104	WA1	HT1	23	23	0
105	n.n.	HT1*	25	25	0
106	n.n.	HT1*	9	9	0
107	n.n.	HT1	16	16	0
108	WA1	HT1	5	5	0
109	*n.n.*	*HT1*	*0*	*0*	*0*

der gesamten Population (Abb. 28).

Von 36 Weibchen wurden keine schlupffähigen Eier erhalten (kursiv in Tab. 28). Von diesen wiesen 35 Individuen den Haplotyp HT1 auf (hiervon sechs Tiere ohne *Wolbachia*-Infektion) und eines den Haplotyp HT2. Dagegen legten alle 7 Weibchen mit HT1* und auch das Weibchen mit HT3 entwicklungsfähige Eier.

3.3.1.2. Bestimmung des *Wolbachia*-Infektionstyps

Mittels Amplifikation und Restriktionsanalyse des Gens *wsp* unter Verwendung des Restriktionsenzyms MaeI wurde der Infektionsstyp jedes Weibchens analysiert (Tab. 28). Unter Berücksichtigung aller 109 Weibchen erwiesen sich 71 als mit dem Stamm wA1 infiziert (65,1%). Sechs Tiere wiesen eine Infektion mit wA2 auf (5,5%), und ein einzelnes Weibchen erwies sich als mit wB infiziert (♀68). Für 27 Individuen, davon 26 mit HT1 (hiervon 6 mit HT1*) und ein Tier mit HT2, wurde für *wsp* kein Amplifikat erhalten, und die entsprechenden Tiere wurden als nicht infiziert betrachtet. In zwei Fällen erwies sich die Determination des Infektionstyps aufgrund unklarer RFLP- Bandenmuster als zweifelhaft (♀39 und ♀58) und für zwei weitere Weibchen konnte der Infektionstyp aufgrund zu schwacher PCR-Produkte nicht bestimmt werden (♀55 und ♀62). Unter der Annahme, dass das Fehlen von PCR-Banden keine falsch-negativen Ergebnisse darstellt, liegt die Infektionsrate innerhalb dieser Gruppe von 109 Weibchen bei 75%.

Tab. 29 MtDNA-Haplotypen und *Wolbachia*-Infektionen derjenigen *A. lythri*-Weibchen, deren Nachkommen für die Verpaarungsexperimente verwendet wurden. Weibchen, von denen männliche Nachkommen erhalten wurden, in Fettdruck. Das Enzym AciI unterscheidet nicht zwischen den Stämmen wA2 und wB.

♀	HT	*ftsZ*	*wsp*	
			AciI	**MaeI**
♀2	HT1	-	wA1	wA1
♀14	HT1	-	wA1	wA1
♀19	HT1	-	-	-
♀25	**HT2**	**+**	**wA2/wB**	**wA2**
♀30	**HT2**	**+**	**wA2/wB**	**wA2**
♀32	**HT1**	**-**	**-**	**-**
♀34	HT1	+	wA1	wA1
♀44	HT1	+	wA1	wA1
♀47	HT1	+	wA1	wA1
♀60	HT1	+	wA1	wA1
♀68	HT3	+	wA2/wB	wB
♀74	HT1	+	wA1	wA1
♀75	HT1	+	wA1	wA1
♀76	**HT2**	**+**	**wA2/wB**	**wA2**
♀79	HT1	+	wA1	wA1
♀82	HT1	+	wA1	wA1
♀85	**HT2**	**-**	**-**	**-**
♀89	HT1	+	wA1	wA1
♀91	HT1*	-	-	-
♀96	**HT2**	**+**	**wA2/wB**	**wA2**
♀100	HT1	-	wA1	wA1
♀103	**HT2**	**+**	**wA2/wB**	**wA2**

Beschränkt man die weiteren Betrachtungen auf diejenigen Weibchen, von denen Nachwuchs erhalten wurde, so ergibt sich folgendes Bild: Von den 73 Weibchen ließ sich bei insgesamt 21 Individuen weder mittels *wsp* noch mittels *ftsZ* eine Infektion mit *Wolbachia* nachweisen. Diese Tiere wurden im Weiteren als nicht infiziert betrachtet. In einem Fall waren die Bakterien zwar nachweisbar, jedoch konnte der Stamm nicht determiniert werden, da kein ausreichendes PCR-Amplifikat erzeugt werden konnte (♀55); in einem anderen Fall erbrachte das Enzym MaeI kein eindeutiges Ergebnis (♀58). Die

verbleibenden Weibchen zeigten die folgenden Infektionstypen: 44 Individuen waren mit wA1 infiziert, bei fünf Individuen ließen sich Wolbachien des Stammes wA2 nachweisen, und bei einem Individuum (♀68) wurde der Stamm wB nachgewiesen.

Vergleicht man die Ergebnisse der RFLP-Analyse zur Determination der Haplotypen und der *Wolbachia*-Infektion, fällt erneut unmittelbar auf, dass ein bestimmter mtDNA-Haplotyp immer mit einem bestimmten *Wolbachia*-Infektionstyp assoziiert ist (Tab. 28). Wie bereits bei den Analysen zur Phylogenie der Gattung *Altica* gesehen, tritt auch hier eine Infektion mit *Wolbachia* des Typs WA1 immer in Assoziation mit dem Haplotyp HT1 auf, während eine Infektion mit WA2 immer mit HT2 assoziiert ist; das Weibchen mit HT3 (♀68) war mit dem Stamm wB infiziert.

Für alle Weibchen, deren Nachkommen letztlich für Verpaarungsexperimente verwendet wurden, wurde der Infektionsstatus mittels Amplifikation der Bakterien-Gene *ftsZ* und *wsp* überprüft; die Bestimmung des tatsächlichen Infektionstyps erfolgte anhand des Gens *wsp* unter Verwendung der Enzyme AciI und MaeI (Tab. 29). In einigen Fällen ergaben sich Abweichungen hinsichtlich des ermittelten Infektionsstatus: bei ♀2, ♀14 und ♀100 konnte eine Infektion zwar mittels wsp, nicht jedoch mittels *ftsZ* nachgewiesen werden. Die Tiere wurden dennoch als infiziert angesehen. Mittels AciI konnte der anhand von MaeI ermittelte Infektionstyp in allen Fällen bestätigt werden (wobei das Enzym AciI allerdings ungenaue Ergebnisse liefert, da es nicht zwischen wA2 und wB unterscheidet).

3.3.2. Anzahl der Nachkommen

Bei der Analyse der direkt von den aus dem Freiland stammenden *A. lythri*-Weibchen erhaltenen Daten zur Anzahl der Nachkommen und zum Geschlechterverhältnis ist zu beachten, dass ein Teil der tatsächlichen Nachkommenzahl in der Untersuchung nicht berücksichtigt werden konnte, da eine unbekannte Anzahl Eier bereits im Freiland abgelegt worden war; daher können die zur Nachkommenzahl erhobenen Daten lediglich als Näherung betrachtet werden.

Tab. 30 Nachkommenzahlen der aus dem Freiland stammenden 73 weiblichen *A. lythri*, die im Labor Nachkommen hervorbrachten; gruppiert nach dem jeweils gefundenen mtDNA-Haplotyp (Spalte 1). Spalte 2: Anzahl der Weibchen des jeweiligen Haplotyps. Spalte 3: Gesamtzahl Nachkommen jeder Haplotyp-Gruppe. Spalte 4: Durchschnittliche Anzahl Nachkommen jedes Weibchens.

mtDNA Haplotyp	**N ♀♀**		**Nachkommen gesamt**		**Nachkommen/♀**	
HT1	59	} 66	2484	} 2684	**42,1**±26,1	} **40,7**±26,2
HT1*	7		200		**28,6**±25,3	
HT2	6		284		**47,3**±32,5	
HT3	1		6		**6**	

Die Zahl der bis zur Imago herangewachsenen Nachkommen der aus dem Freiland stammenden 73 reproduzierenden Weibchen reicht von einem einzelnen bis zu maximal 130 die Geschlechtsreife erreichende Nachkommen (Tab. 28). Verluste durch Larven- und Puppensterblichkeit sind hier nicht berücksichtigt. Aus allen im Labor abgelegten Eiern konnten insgesamt 2974 Imagines aufgezogen werden. Im Mittel brachte jedes der 73 Weibchen des Haplotyps HT1 (inklusive HT1*) 40,7 Nachkommen hervor, während von Weibchen des Haplotyps HT2 durchschnittlich je 47,3 Nachkommen erhalten wurden (Tab. 30). Berechnet man die Nachkommenzahl der Weibchen der Haplotypen HT1 und HT1* getrennt, ergeben sich für HT1 durchschnittlich 42,1 Nachkommen und für HT1* durchschnittlich 28,6 Nachkommen pro Weibchen. Lediglich sechs Nachkommen wurden von dem einzigen Weibchen des Haplotyps HT3 erhalten (♀68). Die Unterschiede in der Anzahl der Nachkommen sind nicht signifikant ($F = 0,98 < F_{(2/69/0,05)} = 3,13$); hierbei wurde das einzige Weibchen, das den Haplotyp HT3 aufwies, in der Berechnung außer Acht gelassen, da nicht von einer repräsentativen Aussage ausgegeangen werden kann. Die hohen Standardabweichungen bei allen Ergebnissen zur Nachkommenzahl unterstreichen die großen individuellen Unterschiede in der Anzahl der Nachkommen bei den einzelnen Weibchen.

Tab. 31 Nachkommenzahlen der aus dem Freiland stammenden Weibchen, gruppiert nach dem Infektionsstatus (infiziert/nicht infiziert). Spalte 1: Berechnung ohne bzw. unter Einbeziehung der Weibchen ohne Nachkommen. Spalte 2: *Wolbachia*-Infektionsstatus der jeweiligen Gruppe. Spalte 3: Anzahl der Weibchen. Spalte 4: Gesamtzahl der Nachkommen. Spalte 5: Durchschnittliche Anzahl Nachkommen pro Weibchen.

Art der Berechnung	**Status ♀**	**Anzahl ♀♀**	**Nachkommen gesamt**	**Nachkommen/♀**
exkl. ♀♀ ohne Nachkommen	infiziert	52	2118	**40,7**±24,5
	nicht infiziert	21	856	**40,8**±32,3
inkl. ♀♀ ohne Nachkommen	infiziert	82	2118	**25,8**±27,7
	nicht infiziert	27	856	**31,7**±33,2

Die Anzahl der von jedem Weibchen erhaltenen Nachkommen lässt keinen Zusammenhang mit dem *Wolbachia*-Infektionsstatus (infiziert oder nicht infiziert) erkennen (Tab. 31). Die Berechnung erfolgte sowohl ohne Berücksichtigung der Weibchen ohne Nachkommen ($F = 0,00021 << F_{(1/71/0,05)} = 3,98$) als auch inklusive der Weibchen ohne Nachkommen ($F = 0,83 << F_{(1/107/0,05)} = 3,94$).

Es finden sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Nachkommen bei mit unterschiedlichen *Wolbachia*-Stämmen infizierten Weibchen (Tab. 32; $F = 0,12 < F_{(3/65/0,05)} = 2,75$ unter Ausschluss beziehungsweise $F = 0,52 < F_{(3/101/0,05)} = 2,70$ unter Einbeziehung derjenigen Tiere, deren Eier sich nicht entwickelten).

Tab. 32 Nachkommenzahlen der aus dem Freiland stammenden Weibchen, gruppiert nach Zugehörigkeit zur Haplogruppe und nach vorhandener bzw. fehlender *Wolbachia*-Infektion. Spalte 1: Berechnung ohne bzw. unter Einbeziehung der Weibchen ohne Nachkommen. Spalte 2: mtDNA-Haplotyp. Spalte 3: *Wolbachia*-Infektionsstatus der jeweiligen Gruppe. Spalte 4: Anzahl der Weibchen, die die jeweilige Kombination aus mtDNA-Haplotyp und *Wolbachia*-Infektionstyp aufwiesen. Spalte 5: Gesamtzahl der Nachkommen. Spalte 6: Durchschnittliche Anzahl Nachkommen pro Weibchen. Die Zahlen hinter den geschweiften Klammern geben die Anzahlen an, wenn HT1 und HT1* zusammengefasst werden. † berücksichtigt wurden 72 der 73 Weibchen, da bei einem der *Wolbachia*-Infektionstyp nicht festgestellt werden konnte. †† berücksichtigt wurden 107 der 109 Weibchen, da bei zweien der *Wolbachia*-Infektionstyp nicht festgestellt werden konnte.

Art der Berechnung	**mtDNA-Haplotyp**	***Wolbachia*-Infektion**	**Anzahl**		**Nachkommen gesamt**		**Nachkommen pro ♀**	
exkl. ♀♀	HT1	wA1	45		1840		**40,9**±23,6	
ohne	HT1	---	13		644		**49,5**±34,1	
Nachkommen †	HT1*	---	6	} 19	145	} 789	**24,2**±24,6	} **41,5**±32,9
	HT2	wA2	5		217		**43,4**±34,6	
	HT2	---	1		67		67	
	HT3	wB	1		6		6	
inkl. ♀♀ ohne	HT1	wA1	73		1840		**25,2**±27,2	
Nachkommen	HT1	---	20	} 26	644	} 789	**32,2**±35,5	} **30,3**±33,1
††	HT1*	---	6		145		**24,2**±24,6	
	HT2	wA2	6		217		**36,2**±35,7	
	HT2	---	1		67		67	
	HT3	wB	1		6		6	

3.3.3. Mitochondrieller Haplotyp und Anteil männlicher Nachkommen

Die im Labor durchgeführte Aufzucht der Nachkommen der im Feld gesammelten Weibchen erbrachte ein bezüglich der Verteilung männlicher beziehungsweise weiblicher Nachkommen auffälliges Muster: Weibchen der Haplotypen HT1 und HT1* brachten mit einer Ausnahme (vgl. ♀32, Tab. 28) ausschließlich weibliche Nachkommen hervor. Männliche Nachkommen wurden, abgesehen von der genannten Ausnahme, ausschließlich von Weibchen des Haplotyps HT2 erhalten, und dies jeweils in einem Anteil von 37,5% bis 59% der Gesamtnachkommenzahl jedes Weibchens (Tab. 33). Der Zusammenhang zwischen dem Fehlen männlicher Nachkommen und dem *Wolbachia*-Infektionsstatus ist zwar weniger eindeutig, da auch offensichtlich nicht infizierte Individuen der Haplotypen HT1 und HT1* ausschließlich weibliche Nachkommen hervorbrachten (Tab. 28), doch macht die Assoziation zwischen HT1 und *Wolbachia*-Stamm wA1 einen Zusammenhang zwischen Infektionsstatus und Geschlechterverhältnis der Nachkommen wahrscheinlich. Besonders erwähnenswert ist die Situation bei ♀32, welches als einziges Weibchen des Haplotyps HT1 einen männlichen Nachkommen hervorbrachte. Bei diesem Weibchen konnte keine *Wolbachia*-Infektion nachgewiesen werden.

Tab. 33 Die sechs weiblichen *A. lythri*, die männliche Nachkommen hervorbrachten, mit Angabe der prozentualen Anteile männlicher Individuen an der jeweiligen Gesamtnachkommenzahl. *nur ein Nachkomme.

Weibchen	**Männliche Nachkommen**
♀25	52,1%
♀30	49,5%
♀32	100%*
♀76	59,0%
♀85	49,3%
♀96	56,5%
♀103	37,5%

3.3.4. Ergebnisse der systematischen Verpaarungen

3.3.4.1. Verpaarungstypen: Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität

Für die systematischen Verpaarungen zwischen Angehörigen verschiedener Infektionstypen (wA1, wA2 und wB beziehungsweise nicht infiziert w-) konnten acht unterschiedliche Kombinationen getestet werden: ♂wA2 x ♀wA1, ♂wA2 x ♀wB, ♂wA2 x ♀w-, ♂w- x ♀wA2, ♂w- x ♀wA1, ♂w- x ♀wB, ♂wA2 x ♀wA2, ♂w- x ♀w-. Der vollständige Datensatz zu den Ergebnissen dieser Verpaarungen findet sich in Anhang A.

Die Verpaarungen wurden mit so vielen Replikaten wie möglich durchgeführt, wobei Verpaarungen, in denen nicht infizierte Männchen beziehungsweise mit wB infizierte Individuen involviert waren, aufgrund der geringen Anzahl entsprechender Käfer stark limitiert waren (je 29 beziehungsweise 11 Verpaarungen). Im Falle der lediglich sechs Weibchen des Infektionstyps wB (die Nachkommen von ♀68) erfolgten fünf der insgesamt 11 Verpaarungen als Zweitverpaarung. Die Weibchen wurden nach einem angemessen erscheinenden Zeitraum nach erfolgter Verpaarung mit einem Männchen erneut (mit je einem anderen Männchen) verpaart. Dies betrifft die Verpaarungen 17 und 31 (Tab. 35). Mit wA1 beziehungsweise wB infizierte Männchen standen nicht zur Verfügung, da die entsprechenden Muttertiere keine männlichen Nachkommen hervorbrachten (Tab. 28).

Tab. 34 Gesamtzahl der abgelegten Eier bzw. der geschlüpften Larven, die durchschnittliche Anzahl der pro Verpaarung abgelegten Eier bzw. geschlüpften Larven sowie die Schlupfraten für jede der acht möglichen Verpaarungsansätze zwischen Tieren mit unterschiedlichem *Wolbachia*-Infektionsstatus. In Fettdruck hervorgehoben sind diejenigen Verpaarungstypen, bei denen das Auftreten cytoplasmatischer Inkompatibilität erwartet werden könnte. N = Anzahl der Verpaarungsansätze.

Verp. Typ	N	Eier	Eier/ Verp.	Larven	Larven/ Verp.	Schlupfrate
♂ ♀						
wA2 x wA1	**87**	**3771**	**43,9**±49,87	**1898**	**22,3**±28,79	**0,345**±0,302
wA2 x wB	**10**	**154**	**15,4**±29,22	**44**	**4,4**±9,57	**0,066**±0,139
wA2 x w-	**26**	**922**	**36,9**±30,02	**496**	**19,5**±19,12	**0,403**±0,264
w- x wA2	3	90	42,2±32,98	37	16,6±21,09	0,424±0,317
w- x wA1	24	661	24,6±44,9	215	7,64±14,29	0,107±0,191
w- x wB	1	16	16	5	5	0,313
wA2 x wA2	28	771	27,5±31,39	460	16,4±21,25	0,342±0,369
w- x w-	1	29	29	7	7	0,241

Aus einigen Verpaarungen gingen aufgrund sich nicht entwickelnder Eier keine Nachkommen hervor. Diese Fälle wurden in die Berechnung der Schlupfraten (Angaben in Anzahl der Larven, die aus den Eiern verpaarter Weibchen schlüpften) mit einbezogen, da ein Zusammenhang mit der *Wolbachia*-Infektion vermutet werden könnte. Nicht mit einbezogen wurden dagegen Verpaarungen, bei denen keine Eiablage erfolgte.

Die ermittelten Schlupfraten bei den acht verschiedenen Verpaarungstypen lagen zwischen 6,6% und 42,4% (Abb. 35, Tab. 34). Individuelle Unterschiede in den Ergebnissen der Verpaarungen bezüglich der Anzahl der abgelegten Eier, der geschlüpften Larven sowie der Schlupfraten drücken sich in den hohen Standardabweichungen aus und lassen

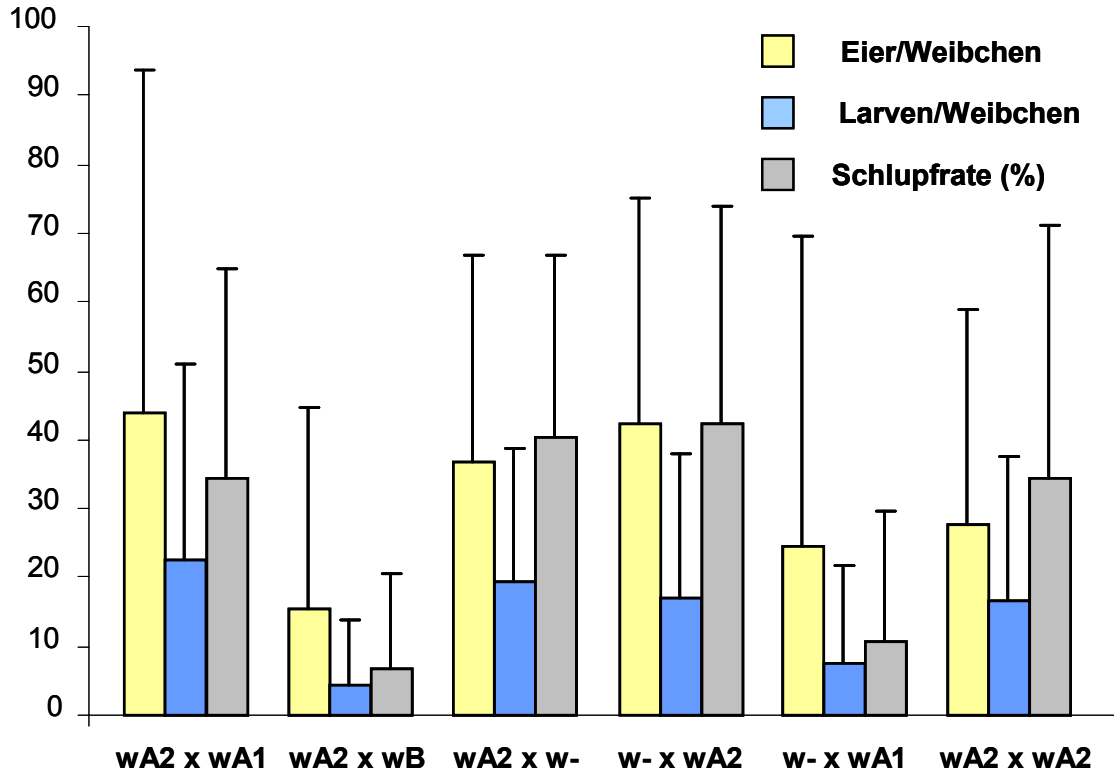

Abb. 35 Darstellung der pro Weibchen abgelegten Eier, der pro Weibchen erhaltenen Larven sowie der Schlupfraten (%) in Abhängigkeit vom jeweiligen Verpaarungstyp, basierend auf dem kompletten Datensatz (Anhang B). Die Verpaarungstypen w- x wB und w- x w- sind nicht dargestellt, da sie jeweils auf von lediglich einem Weibchen erhaltenen Daten beruhen. Anzahl der Verpaarungen: wA2 x wA1: N = 87; wA2 x wB: N = 10; wA2 x w-: N = 26; w- x wA2: N = 3; w- x wA1: N = 24; wA2 x wA2: N = 28.

Unterschiede in der Produktivität und Fertilität der Individuen vermuten. Ein Zusammenhang zwischen potenzieller Kompatibilität beziehungsweise potenzieller Inkompatibilität und einer geringen oder vergleichsweise hohen Schlupfrate lässt sich nicht erkennen. Tatsächlich bestehen zwischen den Verpaarungstypen weder bezüglich der Anzahlen der abgelegten Eier ($F = 1,6 < F_{(5/172/0,05)} = 2,26$) noch der geschlüpften Larven ($F = 2,1 < F_{(5/172/0,05)} = 2,26$ signifikante Unterschiede (hier sind nur diejenigen sechs Verpaarungstypen berücksichtigt, deren Ergebnisse auf mehr als einer Verpaarung basieren; Abb. 35). Die Schlupfraten dagegen sind signifikant unterschiedlich ($F = 4,5 > F_{(5/172/0,05)} = 2,26$). Da diese Unterschiede jedoch auf geringen Schlupfraten sowohl bei potenziell inkompatiblen als auch bei potenziell kompatiblen Verpaarungen beruhen, kann hier kein Zusammenhang hergestellt werden. Fasst man die Daten unter "kompatibel" und "inkompatibel" als Berechnungseinheiten zusammen (Tab. 35), lassen sich zwischen den Verpaarungstypen keine signifikanten Unterschied weder bezüglich der Anzahl der je Weibchen abgelegten Eier (Mann-Whitney-U-Test, $U_x = 287,5 > U_{(15/22/0,05)} = 221$) noch bezüglich der geschlüpften Larven nachweisen ($U_x = 269,5 > U_{(15/22/0,05)} = 221$). Die Schlupfraten lagen bei inkompatiblen Verpaarungen bei 33,4%, bei kompatiblen Verpaarungen bei nur 25,6%. Auch hier lassen sich keine signifikanten Unterschiede

Tab. 35 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung auf cytoplasmatische Inkompatibilität bei Verpaarungen zwischen *Altica*-Individuen mit unterschiedlichem *Wolbachia*-Infektionsstatus. Spalte 1: Verpaarungs-Typ, definiert über den Infektionsstatus/-typ; Fettdruck kennzeichnet potentiell inkompatible Paarungen. Spalte 2: Abstammung des Männchens, definiert über die Nummer des Muttertiers. Spalte 3: MtDNA-Haplotyp des Männchens. Spalte 4: *Wolbachia*-Infektionsstatus des Männchens, determiniert über Analyse des *wsp*-Gens. Spalte 5: Abstammung des Weibchens, definiert über die Nummer des Muttertiers. Spalte 6: MtDNA-Haplotyp des Weibchens. Spalte 7: Infektionstyp des Weibchens. Spalte 8: Anzahl der Replikate. Spalte 9 und 10: Gesamtzahl abgelegter Eier bzw. geschlüpfter Larven. Spalte 11: Durchschnittliche Schlupfrate je Verpaarungstyp. In blauer Schrift markiert sind alle Verpaarungen, bei denen die durchschnittliche Schlupfrate bei über 50% liegt.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Verp. Typ ♂ ♀	**♂**	**HT♂**	**Wolb. ♂**	**♀**	**HT♀**	**Wolb. ♀**	**N Verp.**	**Eier**	**Larven**	**Schlupfrate**
wA2 x wA1	**25**	**HT 2**	**wA2**	**47**	**HT 1**	**wA1**	**10**	**62**	**19**	**30,6%**
wA2 x wA1	**30**	**HT 2**	**wA2**	**14**	**HT 1**	**wA1**	**10**	**0**	**0**	**0%**
wA2 x wA1	**96**	**HT 2**	**wA2**	**79**	**HT 1**	**wA1**	**10**	**182**	**85**	**46,7%**
wA2 x wA1	**104**	**HT 2**	**wA2**	**60**	**HT 1**	**wA1**	**1**	**0**	**0**	**0%**
wA2 x wA1	**25**	**HT 2**	**wA2**	**89**	**HT 1**	**wA1**	**10**	**887**	**505**	**56,9%**
wA2 x wA1	**30**	**HT 2**	**wA2**	**100**	**HT 1**	**wA1**	**8**	**389**	**307**	**78,9%**
wA2 x wA1	**76**	**HT 2**	**wA2**	**44**	**HT 1**	**wA1**	**10**	**1118**	**496**	**44,4%**
wA2 x wA1	**96**	**HT 2**	**wA2**	**14**	**HT 1**	**wA1**	**8**	**415**	**199**	**48%**
wA2 x wA1	**104**	**HT 2**	**wA2**	**34**	**HT 1**	**wA1**	**1**	**0**	**0**	**0%**
wA2 x wA1	**30**	**HT 2**	**wA2**	**14**	**HT 1**	**wA1**	**4**	**100**	**67**	**67%**
wA2 x wA1	**30**	**HT 2**	**wA2**	**34**	**HT 1**	**wA1**	**2**	**45**	**22**	**48,9%**
wA2 x wA1	**25**	**HT 2**	**wA2**	**74**	**HT 1**	**wA1**	**3**	**187**	**113**	**60,4%**
wA2 x wA1	**96**	**HT 2**	**wA2**	**2**	**HT 1**	**wA1**	**8**	**314**	**78**	**24,8%**
wA2 x wA1	**25**	**HT 2**	**wA2**	**47**	**HT 1**	**wA1**	**2**	**72**	**7**	**9,7%**
wA2 x wB	**30**	**HT 2**	**wA2**	**68**	**HT 3**	**wB**	**5**	**51**	**17**	**33,3%**
wA2 x wB	**104**	**HT 2**	**wA2**	**68**	**HT 3**	**wB**	**1**	**86**	**27**	**31,4%**
wA2 x wB	**25**	**HT 2**	**wA2**	**68**	**HT 3**	**wB**	**4**	**17**	**0**	**0%**
wA2 x w-	**76**	**HT 2**	**wA2**	**19**	**HT 1**	**-**	**10**	**66**	**24**	**36,4%**
wA2 x w-	**30**	**HT 2**	**wA2**	**91**	**HT 1***	**-**	**7**	**380**	**200**	**52,6%**
wA2 x w-	**25**	**HT 2**	**wA2**	**91**	**HT 1***	**-**	**6**	**343**	**204**	**59,5%**
wA2 x w-	**76**	**HT 2**	**wA2**	**85**	**HT 2**	**-**	**1**	**0**	**0**	**0%**
wA2 x w-	**25**	**HT 2**	**wA2**	**85**	**HT 2**	**-**	**2**	**133**	**68**	**51,1%**
w- x wA2	32	HT 1	-	25	HT 2	wA2	1	7	2	28,6%
w- x wA2	85	HT 2	-	25	HT 2	wA2	1	76	31	40,8%
w- x wA2	32	HT 1	-	104	HT 2	wA2	1	7	4	57,1%
w- x wA1	85	HT 2	-	34	HT 1	wA1	10	0	0	0%
w- x wA1	32	HT 1	-	79	HT 1	wA1	1	76	26	34,2%
w- x wA1	85	HT 2	-	82	HT 1	wA1	10	421	142	33,7%
w- x wA1	85	HT 2	-	75	HT 1	wA1	2	121	47	38,8%
w- x wA1	32	HT 1	-	79	HT 1	wA1	1	43	0	0%
w- x WB	32	HT 1	-	68	HT 3	wB	1	16	5	31,3%
wA2 x wA2	30	HT 2	wA2	25	HT 2	wA2	10	40	32	80%
wA2 x wA2	25	HT 2	wA2	30	HT 2	wA2	6	339	171	50,4%
wA2 x wA2	30	HT 2	wA2	96	HT 2	wA2	6	118	90	76,3%
wA2 x wA2	76	HT 2	wA2	30	HT 2	wA2	4	266	167	62,8%
wA2 x wA2	76	HT 2	wA2	25	HT 2	wA2	2	8	0	0%
w- x w-	32	HT 1	-	85	HT 2	-	1	29	7	24,1%

nachweisen ($U_x = 286{,}5 > U_{(15/22/0{,}05)} = 221$).

Da die Schlupfraten in keinem Fall signifikant reduziert sind, kann davon ausgegangen werden, dass zwischen den unterschiedlichen *Wolbachia*-Stämmen keine cytoplasmatische Inkompatibilität auftritt.

3.3.4.2. Infektionstypen: Produktivität und Fekundität der Weibchen

Die ermittelten Daten bieten die Möglichkeit, die Anzahl abgelegter Eier beziehungsweise geschlüpfter Larven sowie die Schlupfrate für infizierte und nicht infizierte Weibchen und

auch für die Männchen getrennt zu ermitteln (Tab. 36, Tab. 37). Die Produktivität ist hier die Anzahl der Nachkommen in jeder Verpaarung und ein Maß für die Fekundität. Auch bei diesen Berechnungen wurden Verpaarungen, aus denen keine Eier hervorgingen, nicht berücksichtigt.

Hier erfolgt zunächst eine Aufstellung der Ergebnisse unabhängig vom tatsächlichen Infektionstyp (*Wolbachia*-Stamm) für die in den Verpaarungsexperimenten eingesetzten Weibchen.

Die Anzahlen der gelegten Eier lassen zwischen infizierten und nicht infizierten Weibchen (unabhängig vom tatsächlichen *Wolbachia*-Stamm) keine signifikaten Unterschiede erkennen ($F = 2{,}18 < F_{(1/123/0{,}05)} = 3{,}92$). Die durchschnittliche Anzahl geschlüpfter Larven sowie die Schlupfrate ist zwischen den Gruppen ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich ($F = 0{,}86 << F_{(1/123/0{,}05)} = 3{,}92$). Eine Infektion mit *Wolbachia* hat auch keine Auswirkungen auf die Schlupfrate ($F = 0{,}31 << F_{(1/123/0{,}05)} = 3{,}92$). Wiederum weisen die hohen Standardabweichungen auf individuelle Variabiliät zwischen den Weibchen hin (Tab. 36).

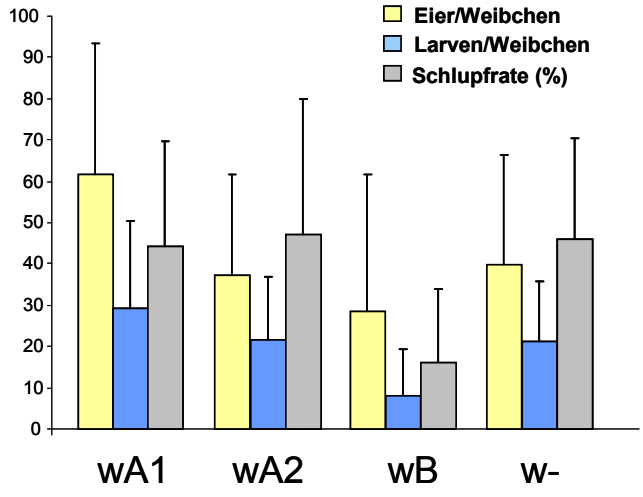

Abb. 36 Anzahl der abgelegten Eier beziehungsweise der geschlüpften Larven sowie die Schlupfrate in Abhängigkeit vom Infektionstyp (wA1, wA2, wB bzw. nicht infiziert) des weiblichen Wirtes. Das Diagramm basiert auf den Mittelwerten der Einzeldaten aus Tab. 37.

Die Ergebnisse lassen sich weiter auflösen, indem der tatsächliche Infektionstyp der jeweiligen Weibchen berücksichtigt wird (Infektion mit wA1, wA2 beziehungsweise nicht infiziert; Abb. 36, Tab. 37). Es zeigt sich, dass diejenigen Weibchen, die eine Infektion mit *Wolbachia* des Stammes wA1 aufwiesen, deutlich mehr Eier legten (durchschnittlich 61,6 Eier pro Weibchen) und auch deutlich mehr Nachkommen hervorbrachten (durchschnittlich 29,3 Larven je Weibchen) als Weibchen, die mit *Wolbachia* des Stammes wA2 infiziert waren (12,6 Larven pro Weibchen) und auch als Weibchen, die keine Infektion aufwiesen (21,0 Larven pro Weibchen). Die Anzahlen der abgelegten Eier sind statistisch signifikant unterschiedlich ($F = 3{,}46 > F_{(3/121/0{,}05)} = 2{,}68$), die Unterschiede in der Anzahl der geschlüpften Larven dagegen nicht ($F = 1{,}94 < F_{(2/116/0{,}05)} = 2{,}68$). Die Schlupfrate liegt bei Weibchen mit einer *Wolbachia*-Infektion des

Tab. 36 Ergebnisse der Verpaarungen zwischen Weibchen und Männchen unterschiedlicher bzw. gleicher Infektionstypen: Auflistung über die Produktivität und Fertilität der Weibchen in Abhängigkeit vom Infektionsstatus, d.h. "infiziert" bzw. "nicht infiziert". *Die Abstammung der Weibchen ist in der ersten Spalte angegeben (Beispiel: '2' bezeichnet alle diejenigen verpaarten Weibchen, die vom Muttertier ♀2 abstammen).

Weibchen*	N Verp.	N Eier	N Larven	Eier/♀	Larven/♀	Schlupfrate
infiziert						
'2'	**7**	314	78	44,9	11,1	0,248
'14'	**12**	515	266	42,9	22,3	0,517
'25'	**9**	131	65	14,6	7,2	0,496
'30'	**10**	605	338	60,5	33,8	0,559
'34'	**2**	45	22	22,5	11,0	0,489
'44'	**10**	1118	496	111,8	49,6	0,444
'47'	**6**	134	26	22,3	4,3	0,194
'68'	**6**	170	49	28,3	8,2	0,288
'74'	**3**	187	113	62,3	37,7	0,604
'75'	**2**	121	47	60,5	23,5	0,388
'79'	**11**	301	111	27,4	10,1	0,369
'82'	**6**	421	142	70,2	23,7	0,337
'89'	**8**	887	505	110,9	63,1	0,570
'96'	**3**	118	90	39,3	30,0	0,763
'100'	**5**	389	307	77,8	61,4	0,790
'103'	**1**	7	4	7,0	4,0	0,571
gesamt	**101**	**5463**	**2659**	**54,1**±45,91	**26,3**±26,86	**0,430**±0,278
nicht infiziert						
'19'	**8**	66	24	8,3	3,0	0,364
'85'	**3**	162	75	54,0	25,0	0,463
'91'	**13**	723	404	55,6	31,1	0,559
gesamt	**24**	**951**	**503**	**39,6**±28,22	**21,0**±18,72	**0,461**±0,246

Tab. 37 Ergebnisse der Verpaarungen zwischen Weibchen und Männchen unterschiedlicher bzw. gleicher Infektionstypen: Auflistung über die Produktivität der Weibchen in Abhängigkeit vom Infektionstyp. *Die Abstammung der Weibchen ist in der ersten Spalte angegeben (Beispiel: '2' bezeichnet alle diejenigen verpaarten Weibchen, die vom Muttertier ♀2 abstammen).

Weibchen*	N Verp.	N Eier	N Larven	Eier/♀	Larven/♀
infiziert					
wA1					
'2'	**7**	314	78	44,9	11,1
'14'	**12**	515	266	42,9	22,3
'34'	**2**	45	22	22,5	11,0
'44'	**10**	1118	496	111,8	49,6
'47'	**6**	134	26	22,3	4,3
'74'	**3**	187	113	62,3	37,7
'75'	**2**	121	47	60,5	23,5
'79'	**11**	301	111	27,4	10,1
'82'	**6**	421	142	70,2	23,7
'89'	**8**	887	505	110,9	63,1
'100'	**5**	389	307	77,8	61,4
gesamt	**72**	**4432**	**2113**	**61,6**±31,8	**29,3**±21,0
wA2					
'25'	**9**	131	65	14,6	7,2
'30'	**10**	605	338	60,5	33,8
'96'	**3**	118	90	39,3	30
'103'	**1**	7	4	7	4
gesamt	**23**	**861**	**497**	**37,4**±24,4	**21,6**±15,3
wB					
'68'	**6**	170	49	**28,3**±33,2	**8,1**±11,34
nicht infiziert					
'19'	**8**	66	24	8,3	3
'85'	**3**	162	75	54	25
'91'	**13**	723	404	55,6	31,1
Gesamt	**24**	**951**	**503**	**39,6**±26,9	**21,0**±14,8

Typs wA2 bei 57,7%, bei nicht infizierten Weibchen bei 52,9%, für Weibchen des Infektionstyps wA1 jedoch nur bei 47,7%. Die Unterschiede sind wiederum nicht signifikant ($F = 2,35 < F_{(2/116/0,05)} = 3,07$). Die Unterschiede in der Anzahl der abgelegten Eier sind auch dann noch signifikant, wenn die geringe Stichprobe zur Infektion mit wB außer Acht gelassen wird ($F = 4,19 > F_{(2/116/0,05)} = 3,07$). Die Weibchen mit einer Infektion mit dem Stamm wA1 legten folglich signifikant mehr Eier als alle anderen Weibchen; die Anzahl der Nachkommen unterscheidet sich zwischen den Gruppen jedoch nicht.
Vergleicht man die Anzahl der abgelegten Eier und der geschlüpften Larven in Abhängigkeit vom mitochondriellen Haplotyp und ohne Berücksichtigung der *Wolbachia*-Infektion der jeweiligen Weibchen, erweisen sich die Unterschiede als nicht signifikant ($F= 1,63 < F_{(3/121/0,05)} = 2,68$ beziehungsweise $F = 1,9 < F_{(3/121/0,05)} = 2,68$). Dieses Ergebnis unterstützt den Verdacht, dass die erhöhte Eiablagerate bei mit wA1 infizierten Weibchen ein Effekt der *Wolbachia*-Infektion ist. Die Schlupfraten sind bei den drei Infektionstypen signifikant unterschiedlich ($F= 3,09 > F_{(3/121/0,05)} = 2,68$); dies ist auf den Effekt der geringen Schlupfrate bei den Weibchen des Haplotyps HT3 zurückzuführen und basiert wahrscheinlich auf der geringen Stichprobengröße (sechs Weibchen, die alle von einem Muttertier abstammten).

3.3.4.3. Prüfung auf Parthenogenese

Mehr als 2500 Weibchen blieben bei dieser Untersuchung unverpaart. Diese Tiere wurden genutzt, um zu überprüfen, ob von virginellen Weibchen gelegte Eier entwicklungsfähig sind. Es wurde eine entsprechend große Anzahl Eier erhalten; anders als bei verpaarten Weibchen erfolgte die Ablage dieser nicht in Gruppen (Abb. 1), sondern die Eier wurden einzeln an den Wänden der Plastikgefäße und an den Blättern der Fraßpflanze verteilt. Keines dieser Eier erwies sich als entwicklungsfähig. Daher kann die Hypothese, dass *A. lythri* sich parthenogenetisch fortpflanzt, verworfen werden.

3.3.4.4. Zeitliche Komponente

Um zu testen, ob die starken Schwankungen in der Anzahl der abgelegten Eier und somit der Schlupfrate der Larven aus diesen Eiern eine zeitliche Komponente beherbergt und möglicherweise eine Abhängigkeit von der Jahreszeit aufweist, wurde der Zeitpunkt (Datum), zu dem die Verpaarungen angesetzt wurden, gegen die von jeder Gruppe (sortiert nach Datum der Zusammenbringung der Paarungspartner) hervorgebrachten Eier beziehungsweise Larven aufgetragen (Abb. 37). Aus den Daten geht hervor, dass die

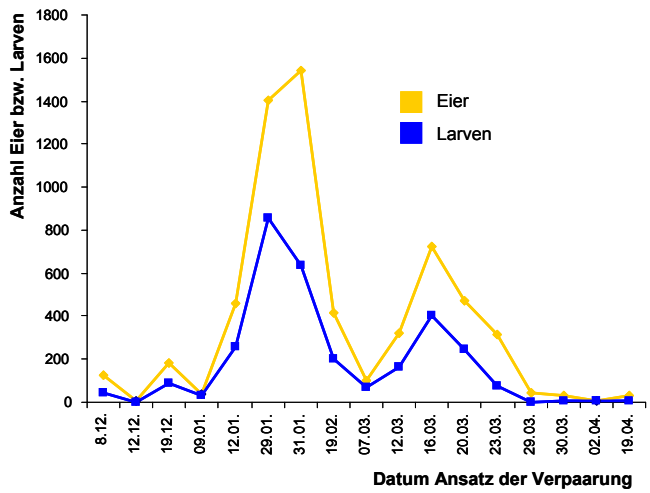

Abb. 37 Anzahl abgelegter Eier bzw. geschlüpfter Larven in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Ansatzes der jeweiligen Verpaarung (zwischen Dezember 2006 und April 2007).

Anzahl der angelegten Eier etwa vier Wochen nach Ende der Diapause (Entnahme der Tiere aus dem Kühlschrank und Verbringung in einen Klimaschrank mit Langtagsbedingungen bei 18°C) stark anstieg und nach weiteren vier Wochen ebenso stark wieder abfiel. Einen weiteren Anstieg der Eiproduktion erkennt man wieder vier Wochen später, jedoch ist dieser deutlich geringer als der vorherige. Ende März, also fast vier Monate nach Ende der Diapause, sank die Eiproduktion auf nahezu null ab. Die Anzahl der geschlüpften Larven (Daten bezogen auf den jeweils zugehörigen Verpaarungsansatz) stieg und fiel mit der Anzahl der abgelegten Eier.

3.4. Karyologische Untersuchung der Art *Altica lythri*

Die karyologische Untersuchung wurde in der Absicht durchgeführt, die Art *A. lythri* auf eine mögliche Polyploidisierung hin zu überprüfen. Da viele sich obligat parthenogenetisch fortpflanzende Insekten einen polyploiden Chromosomensatz aufweisen, könnte ein erhöhter Chromosomensatz bei *A. lythri* ein Hinweis auf unisexuelle Fortpflanzung sein, womit sich dann wiederum erklären ließe, warum manche Weibchen (mindestens diejenigen des Haplotyps HT1) ausschließlich weibliche Nachkommen hervorbringen.

Tab. 38 Ergebnisse der stichprobenartigen karyologischen Untersuchung der Arten *A. aenescens* und *A. ericeti* sowie einiger weiterer Exemplare der Art *A. lythri* weiterer Populationen. Spalte 1: Angabe der Artzugehörigkeit. Spalte 2: Herkunft des jeweiligen Individuums. Spalte 3: Untersuchtes Gewebe. Spalte 4: geschätzte Anzahl der gefundenen Chromosomen je Zelle.

Art	Population	Gewebe	ausgezählte Zellen	Anzahl Chr./Zelle
A. aenescens	Koberg, SH	Eier		~ 24
		Hoden		~ 12
		Puppe		~ 24
A. ericeti		Eier		~ 24
A. lythri	Altenteil, SH	Ovariolen	1	mind. 24
	Bordesholm, SH	Hoden	7	~ 12
	Reisdorf, TH	Ovariolen		~ 12
		Hoden		~ 12

Insgesamt konnten die Chromosomenzahlen in den Zellen der Eier von 21 Weibchen aus drei verschiedenen Populationen (14 Individuen von insgesamt 25 aus der Population „Güster“, 6 Individuen von insgesamt 14 aus der Population „Königreich“ und ein

Tab. 39 Zusammenfassung der Ergebnisse der karyologischen Untersuchung von 21 weiblichen Individuen dreier Populationen der Art *A. lythri*. Es sind lediglich diejenigen Individuen aufgelistet, aus deren Eiern brauchbare Präparate erhalten wurden. Spalte 1: Nummer des Weibchens. Spalte 2: Name der jeweiligen Population; SH-Schleswig-Holstein; NI-Niedersachsen. Spalte 3: Individueller Code für jedes Einzeltier. Spalte 4: Anzahl der ausgezählten Zellen pro Individuum; Daten je von mehreren Eiern. Spalte 5: ungefähre Anzahl der Metaphase-Chromosomen pro ausgezählte Zelle. In Fettdruck: Ungewöhnliche Chromosomenzahl von 12 statt 24.

♀ Nr.	Population	Code	ausgezählte Zellen	Anzahl Chr./Zelle
1	Güster, SH	G1	1	~ 24
2		G2	2	~ 24
3		G3	5	~ 24
4		G5	3	~ 24
5		G8	1	~ 24
6		G9	6	~ 24
7		G11	1	~ 24
8		G12	3	~ 24
9		G15	5	~ 24
10		G18	1	~ 24
11		G19	1	~ 24
12		G21	1	~ 24
13		G23	4	~ 24
14		G25	1	~ 24
15	Königreich, Jork, NI	K2	1	~ 20
16		K5	3	~ 24
17		K7	10	~ 12
18		K8	1	~ 24
19		K10	3	~ 24
20		K12	2	~ 24
21	Wedel, SH	W11	2	~ 24

Individuum aus der Population „Wedel“) bestimmt werden (Tab. 39). In 12 von 21 Fällen konnten die Chromosomen für jedes Weibchen für mehr als eine Zelle ausgezählt werden, in den anderen Fällen konnten die Daten nur für jeweils eine Zelle erhoben werden. Bei manchen Werten handelt es sich um Schätzwerte, da die Chromosomen in Folge von Überlagerungen mitunter nicht klar voneinander zu trennen waren. In den weitaus meisten Fällen wurde eine Anzahl von 24 Chromosomen pro Zelle gefunden, nur in einem Fall fanden sich lediglich 12 Chromosomen. In keinem Fall fanden sich mehr als 24 Chromosomen pro Zelle, welches der gewöhnlich bei *Altica* gefundenen Anzahl entspricht (bekannte Chromosomenzahl bei männlichen *A. lythri* (Hoden): 11^{II}+X+y; Segarra & Petitpierre 1982). Fälle von Polyploidie konnten somit nicht nachgewiesen werden. Eine Zahl von nur 12 Chromosomen entspräche folglich dem halben normalen Chromosomensatz. Dieser Chromosomensatz fand sich bei einem Weibchen aus der Population „Königreich“ in mehr als 10 Zellen, die mehreren verschiedenen Eiern entstammten.

Für die Art *A. aenescens* wurden geschätzte Chromosomenzahlen von etwa 24 Chromosomen sowohl für die Eier als auch für das Gewebe der Puppe und etwa 12 Chromosomen für Zellen des Hodengewebes ermittelt (Abb. 38, Tab. 38). Bei *A. ericeti* fanden sich in den analysierten Eiern ebenfalls etwa 24 Chromosomen je Zelle. Bei den zusätzlich analysierten Individuen der Art *A. lythri* aus Reisdorf (Thüringen) und Bordesholm (Schleswig-Holstein) lässt sich die Chromosomenzahl in Hoden- und Ovariolengewebe auf 12 schätzen (Abb. 38), die Anzahl stimmt somit mit der bei *A. aenescens* und *A. ericeti* gefundenen überein. Dagegen fanden sich in der einzigen auswertbaren Zelle aus dem Ovariolengewebe eines Tieres aus der Population in Altenteil (Schleswig-Holstein) 24 oder mehr Chromosomen.

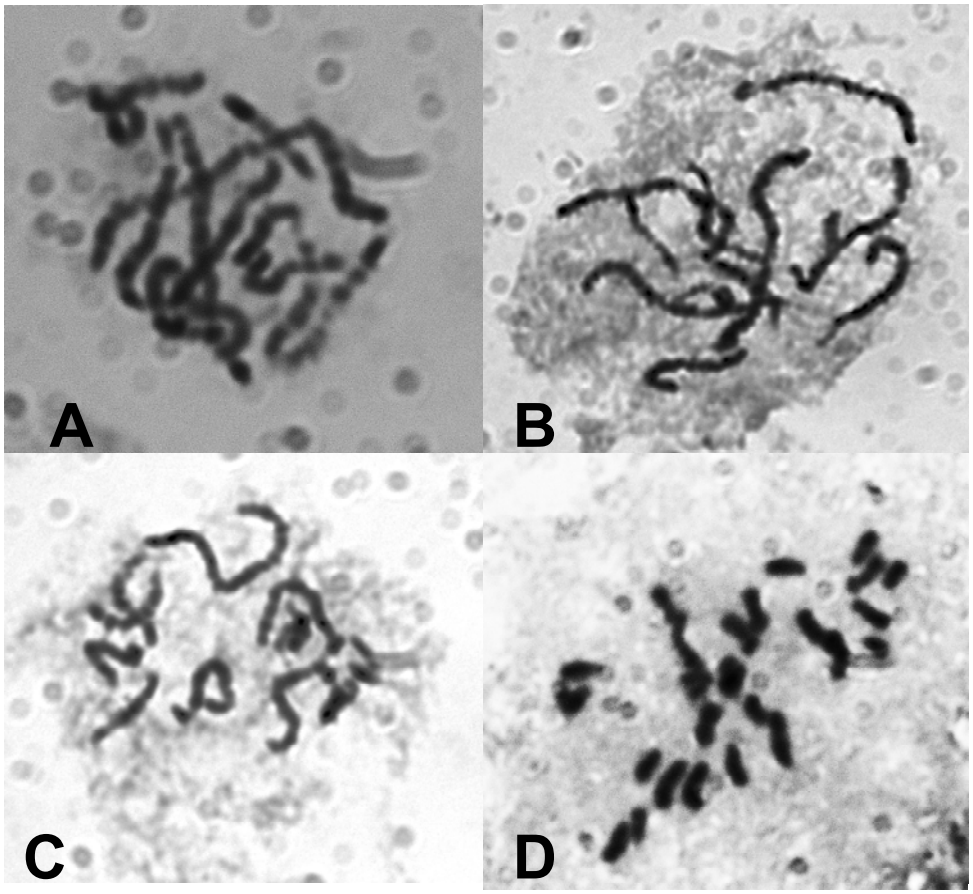

Abb. 38 A - C: Metaphase-Chromosomen einer weiblichen *A. lythri* (Population Reisdorf, TH), jeweils eine Zelle, aus Ovariolengewebe. **D**: Metaphase-Chromosomen einer weiblichen *A. aenescens* Koberg, SH), eine Zelle eines befruchteten Eies.

4 Diskussion

Ansätze zur Erklärung der bei *Altica* und insbesondere bei der Art *A. lythri* nachgewiesenen Besonderheiten

Das Phänomen der von Weibchen dominierten Populationen bildete den Ausgangspunkt für alle Untersuchungen, die im Zuge der vorliegenden Arbeit über die Gattung *Altica* und insbesondere über *A. lythri* durchgeführt wurden. Zwar weisen mehrere Arten dieser Flohkäfergattung dieses Merkmal auf; so wurden von Weibchen dominierte Populationen auch bei *A. oleracea* und *A. palustris* beobachtet, doch stellen weitere Charakteristika die Art *A. lythri* als außergewöhnlich interessant heraus: Sie ist - auf der Basis ihrer mitochondriellen DNA - polyphyletisch und beherbergt zudem drei unterschiedliche *Wolbachia*-Stämme, die den sogenannten Supergroups A und B angehören. Diese drei Stämme sind konstant jeweils mit einem bestimmten mtDNA-Haplotyp der Wirtsart assoziiert und bieten potentiell Anlass zu der Vermutung, dass es einen Zusammenhang gibt zwischen der Infektion mit diesen Bakterien und den reproduktiven Besonderheiten, die bei *A. lythri* aufgedeckt werden konnten. Denn zum Einen weisen Populationen von *A. lythri* sehr oft ein extremes Ungleichgewicht der Geschlechterverteilung auf, das mit dem Vorherrschen bestimmter mitochondrieller Haplotypen und somit *Wolbachia*-Stämme korreliert; gleichzeitig unterscheiden sich solche Populationen, in denen das Geschlechterverhältnis ausgeglichen oder ausgeglichener ist, in der Häufigkeit der einzelnen, für *A. lythri* typischen mitochondriellen Haplotypen. Zum Anderen konnte nachgewiesen werden, dass bei *A. lythri* der mtDNA-Haplotyp beziehungsweise der Infektionstyp darüber entscheidet, ob ein Weibchen ausschließlich weibliche Nachkommen oder Nachkommen mit einem ausgeglichenen Geschlechterverhältnis hervorbringt, während eine Beeinflussung der reproduktiven Kompatibilität zwischen Männchen und Weibchen durch *Wolbachia* offenbar nicht vorliegt. Doch der Ausgangspunkt für alle Diskussionen und Überlegungen, die im Folgenden getroffen werden sollen, ist die Phylogenie der Gattung *Altica*, und hierbei insbesondere die polyphyletischen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der weit verbreiteten Art *A. lythri*.

4.1. Phylogenetische Untersuchungen: Analyse der Polyphylie von *Altica lythri*

4.1.1. Die Phylogenie der Gattung *Altica* auf der Grundlage mitochondrieller Daten

Die Ergänzung der mitochondriellen Phylogenie der Gattung *Altica* von 32 Individuen aus zehn Arten auf insgesamt 115 Individuen aus 18 Arten (hiervon zwei Arten bisher unbestimmt) und ihre Analyse bestätigt die Existenz polyphyletischer Gruppierungen, die

in erster Linie die Art *A. lythri* betreffen. Zudem konnte jetzt ein dritter Haplotyp (HT3) nachgewiesen werden, der ebenfalls nicht in monophyletischer Beziehung zu den übrigen Gruppierungen dieser Art steht, sondern die betreffenden Individuen in nahe Verwandtschaft mit *A. engstroemi* und *A. quercetorum* stellt. Die Bestätigung des bisherigen Ergebnisses, dass *A. lythri* auf der Grundlage ihrer mitochondriellen DNA keine monophyletische Gruppe bildet, ist nach den umfangreichen phylogenetischen Analysen weiterhin offensichtlich und macht diese Art insbesondere im Zusammenhang mit der Infektion mit *Wolbachia* außergewöhnlich interessant.

Die intraspezifischen Distanzen zwischen den Haplotypen HT1, HT2 und HT3 sind so groß, dass auf drei unterschiedliche Arten geschlossen werden könnte, doch weshalb diese Möglichkeit hier nicht näher in Betracht gezogen wird, soll im Folgenden erörtert werden.

4.1.2. Polyphyletische Muster: Erklärungsansätze

4.1.2.1. Morphologische Merkmale

Bei *A. lythri* findet sich eine deutliche Diskrepanz zwischen den festgelegten Artgrenzen und der Genealogie der mtDNA. Zur Erklärung der polyphyletischen Gruppierung müssen mehrere mögliche Gründe in Erwägung gezogen werden. Grundsätzlich ist die Ursache für diese Darstellung der Art sicherlich die Verwendung des mitochondriellen Genoms zur Rekonstruktion der Verwandtschaftsverhältnisse und nicht fehlerhafte Artbestimmung. Dennoch kann nicht bestritten werden, dass die Gattung *Altica* eine schwierig zu bestimmende Gruppe darstellt. Da die sichersten, da konstantesten Bestimmungsmerkmale bei männlichen Exemplaren gefunden werden, Männchen jedoch bei vielen Arten selten sind (auch für die hier vorliegende Untersuchung konnte nicht in allen Fällen auf Männchen zurückgegriffen werden), musste auch hier eine Bestimmung der Tiere in erster Linie auf weiblichen Individuen beruhen. Gerade die kombinierte Betrachtung mehrerer Merkmale führt aber sicherlich zu einer korrekten Artbestimmung. Die Artzuordnung auf der Grundlage der Genitalmorphologie sowie äußerer Merkmale in Kombination mit der Information über die Nahrungspflanze wird von anderen Autoren empfohlen (Mohr 1966, Kangas & Rutanen 1993) und wurde in dieser Arbeit, soweit möglich, befolgt. Auch unter Berücksichtigung einer gewissen Variabilität der verwendeten Merkmale konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, dass sich unter den als *A. lythri* bestimmten Arten mehrere Arten verbergen, denn die beobachtete Variabilität in Genitalmerkmalen und äußerer Morphologie (insbesondere der Stirnhöckerchen und des Stirnkiels) korreliert nicht mit dem Auftreten eines bestimmten mitochondriellen Haplotyps. Da gewöhnlich die

Genitalmerkmale weiblicher *Altica* im Vergleich zu denen der Männchen als unsicherer und variabler eingestuft werden, wurde besonderes Augenmerk auf die Analyse männlicher Individuen gelegt, die aufgrund der Häufigkeit der Art *A. lythri* hier in deutlich höherer Anzahl zur Verfügung standen als bei anderen Arten. Die Aedeagi (die, wie von vielen Autoren angemerkt, zuverlässige Bestimmungsmerkmale bieten: Siede 1998, Mohr 1966) von Männchen des Haplotyps HT2 und des Haplotyps HT3 lassen keinerlei Unterschiede erkennen, während die Abgrenzung dieser Haplogruppen zu anderen definierten Arten eindeutig ist. Somit kann auch bestätigt werden, dass der Aedeagus gute morphologische Merkmale bietet, die, soweit hier zu beobachten gewesen, zwischen den Arten sehr variabel, innerhalb einer Art jedoch stark konserviert sind.
Wenn es sich bei den unterschiedliche mitochondrielle Haplotypen aufweisenden Tieren um nicht erkannte Unterarten oder um nah verwandte unterschiedliche Arten handelt, sollten diese außerdem auf genetischer Ebene untereinander die größte Ähnlichkeit aufweisen; dies ist jedoch nicht der Fall. Stattdessen weist jede der Sequenzen der drei wesentlichen Haplotypen HT1, HT2 und HT3 eine deutlich größere Sequenzähnlichkeit mit einer oder mehreren morphologisch von allen *A. lythri* abweichenden Arten auf.

Neben *A. lythri* finden sich in der Phylogenie auf der Grundlage der mtDNA zwei weitere Fälle von nicht-monophyletischen Gruppierungen.
Zunächst soll hier auf die vier Individuen des Taxons *A.* sp. 1 eingegangen werden. Morphologisch gesehen scheinen alle Exemplare identisch; sie stammen alle vom selben Fundort, an dem insgesamt 12 Tiere gesammelt werden konnten, und der durch einen kleinen Bestand der Weidenröschenart *Epilobium angustifolium* gebildet wurde, welche offensichtlich die Fraßpflanze darstellt.
Auch wenn eine Bestimmung dieser Tiere derzeit nicht gelungen ist, fanden sich doch Anhaltspunkte, worum es sich bei *A.* sp. 1 (und dies betrifft auch die beiden aus der Schweiz stammenden Exemplare von *A.* sp. 2) möglicherweise handeln könnte. Morphologisch lassen sich zwischen den Taxa keine Unterschiede erkennen, dennoch unterstützt lediglich die Analyse des Markers ITS2 die Hypothese, dass es sich um die gleiche Art handelt. Sämtliche Exemplare sind weiblich und erinnern äußerlich an *A. oleracea* und *A. palustris*. Betrachtet man jedoch die Genitalmerkmale, so lässt sich die Form der Styli keiner heimischen Art zuordnen; anhand der Spermathek könnte man dagegen auf *A. lythri* schließen. Sowohl Styli, Spiculum ventrale und auch - im Falle von *A.* sp. 1 - die Fraßpflanze *E. angustifolium* lassen dagegen auf die von Norwegen bis zum

Kaspischen Meer verbreitete Art *A. chamaenerii* schließen. Insbesondere wird dieser Verdacht dadurch erregt, dass die Ausprägung der Styli exakt mit den Zeichnungen bei Kangas & Rutanen (1993) übereinstimmt. Hier muss jedoch der Tatsache Rechenschaft getragen werden, dass *A. chamaenerii* weder aus Deutschland noch aus der Schweiz bekannt ist (http://www.faunaeur.org/distribution.php).

Der andere Fall betrifft die Art *A. aenescens*. Die abweichende mtDNA-Sequenz eines der drei analysierten Individuen, die eine nähere Verwandtschaft mit *A. lythri* (HT2) nahelegt, ist mit fehlerhafter Artbestimmung ebenso wenig erklärbar. Tatsächlich scheinen beide Arten nah verwandt; dies kann nicht nur aus den Daten der mtDNA-Sequenzen geschlossen werden, sondern es spricht hierfür auch die Genitalmorphologie sowohl der Weibchen als auch der Männchen (Kangas & Rutanen 1992, Siede 1998). Die äußere Morphologie beider Arten lässt jedoch deutliche Unterschiede erkennen, die eine Verwechslung der Arten ausschließen. Der Fundort und die jeweilige Fraßpflanze macht eine Fehlbestimmung ebenfalls äußerst unwahrscheinlich. Am Fundort von *A. aenescens* wurden - auch im weiteren Umkreis - keine Individuen der Art *A. lythri* gefunden; auch die Fraßpflanze von *A. lythri* konnte am Standort nicht nachgewiesen werden. Alle *A. aenescens* wurden auf jungen Birken gesammelt, so ist auch aus diesem Grund eine versehentliche Vermengung mit *A. lythri* sehr unwahrscheinlich.

Da fehlerhafte Artbestimmung als Ursache für die polyphyletischen Gruppierungen ausgeschlossen werden kann, müssen zur Erklärung der beobachteten Muster andere Erklärungen herangezogen werden.

4.1.2.2. Die Probleme bei der Verwendung mitochondrieller DNA

Es ist davon auszugehen, dass die auf mtDNA-Sequenzen basierende Phylogenie der Gattung *Altica* zumindest für die Art *A. lythri* nicht die tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnisse wiedergibt, sondern von besonderen Gegebenheiten, die sich aus der Verwendung mitochondrieller DNA ergeben, geprägt ist. Da die mitochondrielle DNA einzig die maternale Linie widerspiegelt, kann eine auf dieser Grundlage rekonstruierte Phylogenie von den tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnissen zwischen Organismen aus verschiedenen Gründen entscheidend abweichen. Paraloge Pseudogene, erhalten gebliebene ursprüngliche Polymorphismen (das sogenannte unvollständige "lineage sorting"), ferner Rekombination und "paternal leakage" (beides selten) und insbesondere interspezifische Hybridisierung und Introgression und im Zusammenhang damit der Einfluss vertikal übertragener Symbionten bilden die Grundlage für eine ganze

Reihe von Erklärungsansätzen und Diskussionen (Funk & Omland 2003, Jiggins 2003, Ballard & Whitlock 2004, Hurst & Jiggins 2005).

4.1.2.3. Pseudogene

Da die molekulare Evolution von Pseudogenen Charakteristika aufweist, die auf der eingeschränkten Funktionalität dieser Sequenzen beruhen, nämlich hohe Substitutionsraten, Leserahmenverschiebungen und Stop-Codons, die zum Abbruch der Transkription führen, kann man davon ausgehen, dass derartige, nicht mehr funktionale DNA-Abschnitte anhand der Nukleotidabfolge mindestens im Vergleich mehrerer Taxa erkennbar sind. Es finden sich bei den für *Altica* erhaltenen mtDNA-Sequenzen keine Hinweise auf derartige Charakteristika. Zwischen den in beide Richtungen sequenzierten Abschnitten traten keine Zweideutigkeiten auf, welche zumindest als Hinweis auf das Auftreten zweier alternativer DNA-Sequenzen, bedingt durch gleichzeitige Amplifikation von Gen und Pseudogen, hätten gewertet werden können. Andererseits, bei alleiniger Sequenzierung des Pseudogens, sollten die oben genannten Merkmale zutage treten. Es fanden sich jedoch weder Stop-Codons im codierenden Bereich der analysierten Gene noch Hinweise auf eine erhöhte Substitutionsrate. Die Möglichkeit, dass unbemerkt Pseudogene sequenziert wurden, scheidet als Ursache für die polyphyletische Auflösung der Art *A. lythri* noch aus einem anderen Grund aus: Es erscheint sehr unwahrscheinlich, dass mehrere Pseudogen-Sequenzen untereinander eine so große Ähnlichkeit aufweisen, dass sie als distinkte Gruppen in der Phylogenie gruppiert werden, wie es bei den von *A. lythri* gebildeten Haplogruppen der Fall ist.

4.1.2.4. Unvollständiges "lineage sorting"

Das sogenannte unvollständige "lineage sorting" bezeichnet das Überdauern von DNA-Polymorphismen über Artaufspaltungen hinaus (Maddison 1997); es tritt bei der Rekonstruktion von phylogenetischen Beziehungen als Ursache für die Bildung nicht-monophyletischer Gruppen immer wieder auf. Der Prozess des "lineage sorting" zeichnet divergierende Arten grundsätzlich aus; er verläuft von Polyphylie über Paraphylie letztlich hin zu Monophylie. Daher spielt der Zeitpunkt der Probennahme für phylogenetische Untersuchungen eine wesentliche Rolle, denn aus der Analyse unvollständig getrennter DNA-Linien ergibt sich eine Phylogenie, die nicht die tatsächliche Chronologie der Artaufspaltung wiedergibt (Funk & Omland 2003). Die Ursache ist die dem Zufall

unterliegende Verteilung unterschiedlicher Allelkopien bei einem Speziationsereignis, die dazu führt, dass verschiedene Arten gleiche Linien teilen.

Wenn man allerdings versucht, die Polyphylie der Art *A. lythri* mit diesem Phänomen zu erklären, muss man annehmen, dass die hier durchgeführte Analyse drei völlig unterschiedliche mtDNA-Linien umfasst, die einen ursprünglichen Polymorphismus widerspiegeln, und dass dieser Polymorphismus über einen sehr langen Zeitraum erhalten geblieben ist, während dessen sich mindestens zehn weitere, ganz unterschiedliche Arten abspalteten. Schon dies allein erscheint nicht plausibel. Die Koaleszenz-Theorie bietet zudem Anhaltspunkte dafür, dass eine Phylogenie, die auf mitochondriellen Daten beruht, mit höherer Wahrscheinlichkeit die tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnisse widerspiegelt als eine auf nukleären Daten beruhende Analyse. Es ist zu erwarten, dass mitochondrielle DNA weniger von diesem Problem betroffen ist, denn die effektive Populationsgröße beträgt nur ein Viertel von der der nukleären DNA (Moore 1995). Somit ergibt sich, dass der Zeitraum bis zur Koaleszenz des mitochondriellen Genoms im Vergleich mit dem Zeitraum zwischen zwei Speziationsereignissen deutlich kürzer ist.

Abgesehen von diesen Einschränkungen könnte man jedoch dennoch annehmen, dass kürzliche Artbildung und vorübergehende Retention von mtDNA-Polymorphismen der Grund für die nicht-monophyletischen Gruppierung der Arten *A. aenescens* und *A.* sp. 1 ist. Dagegen kann man allerdings halten, dass *A. aenescens* und *A.* sp. 1 auf der Grundlage ihrer nukleären DNA monophyletisch sind. Dieser Befund spricht eher für die Folgen von Hybridisierungen zwischen verschiedenen Arten, wenn man davon ausgeht, dass unvollständiges "lineage sorting" nukleäre Marker mit höherer Wahrscheinlichkeit betrifft als mtDNA-Marker. Jedoch bleibt hier die Frage, ob die geringe Auflösung, die der Marker ITS2 für *Altica* bietet, überhaupt ausreichend ist, um diesen Vergleich zu ziehen und daraus Schlußfolgerungen abzuleiten.

4.1.2.5. Rekombination und "paternal leakage"

Hinweise auf Rekombination bei mitochondrieller DNA fanden sich in verschiedenen Taxa, unter anderem auch bei Insekten (Piganeau et al. 2004, Tsaousis et al. 2005), doch wird dieses Thema teilweise kontrovers diskutiert (Lunt & Hyman 1997, Ladoukakis & Zouros 2001, Hoarau et al. 2002, Andolfatto et al. 2003, Burzynski et al. 2003, Kraytsberg et al. 2004, Gantenbein et al. 2005, Guo et al. 2006, Ujvari et al. 2007). Rekombination zwischen Mitochondrien setzt voraus, dass ein Individuum Träger mehr als eines mtDNA-Haplotyps ist, die folglich von beiden Elternteilen stammen müssen. "Paternal leakage"

kann die Ursache für eine derartige Heteroplasmie sein (Ballard & Whitlock 2004); tatsächlich existieren Hinweise, dass Mitochondrien auch paternal vererbt werden können (Gyllensten et al. 1991, Magoulas & Zouros 1993, Skibinski et al. 1994, Zouros et al. 1994, Schwartz & Vissing 2002, Kvist et al. 2003). Nachweise für paternal leakage wurden auch für Insekten erbracht (Kondo et al. 1990, Fontaine et al. 2007). Die Konsequenzen für die Interpretation eines auf mitochondrieller DNA beruhenden Datensatzes ergeben sich daraus, dass dieser als Folge von Rekombination ein komplexes Netzwerk bildet (Hey 2000); für einige Individuen kann der ermittelte phylogenetische Status fehlerhaft sein (Piganeau et al. 2004). Angesichts der eher selten erbrachten Hinweise auf die Existenz dieser Phänomene sollen diese hier jedoch nur am Rande genannt werden, da für die Polyphylie der Art *A. lythri* mit Hilfe anderer Vorgänge einfacher erklärt werden kann (nachfolgender Absatz sowie Abschnitt 4.1.4).

4.1.2.6. Interspezifische Hybridisierung und Introgression von mtDNA

Introgression von DNA als Folge von Hybridisierung zwischen Arten führt unmittelbar zu Polyphylie. Letztlich funktioniert sie über Rückkreuzung der Hybriden mit einer der Elternarten und lässt Gene die Artgrenzen überqueren. Es ist bekannt und es wurde oft gezeigt, dass insbesondere das mitochondrielle Genom von Introgression betroffen ist (Beispiele: Sota et al. 2001, Croucher et al. 2004, Prowell et al. 2004, Sullivan et al. 2004, Bachtrog et al. 2006, Gompert et al. 2008, Schmidt & Sperling 2008). Folglich können zwei Arten die gleiche mtDNA-Variante beziehungsweise eine Art zwei sehr unterschiedliche mtDNA-Haplotypen aufweisen. Da mitochondrielle DNA im Gegensatz zum nukleären Genom nicht der Rekombination unterliegt, bleiben die entsprechend entstehenden Muster im Laufe der Evolution und der Artbildungsereignisse lange erhalten, während "fremde" nukleäre Gene im Genpool einer Art bald nicht mehr auszumachen sind. Dies wirkt sich natürlich entscheidend auf die Verwendung mitochondrieller DNA für phylogenetische Analysen aus, da die tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den untersuchten Arten nicht wiedergegeben werden (Machado & Hey 2003). Als Folge von Hybridisierung und Introgression lassen sich auch die großen Sequenzunterschiede zwischen den bei *A. lythri* nachgewiesenen Haplotypen erklären; die Polyphylie der Art *A. lythri* wäre somit eine Folge interspezifischer Hybridisierung. Auf diese Hypothese soll im Folgenden näher eingegangen werden.

4.1.3. Phylogenetische Analyse der Gattung *Altica* auf der Grundlage von ITS2

Um in der Lage zu sein, die Hypothese über Hybridisierung und Introgression von mtDNA innerhalb der Art *A. lythri* zu überprüfen, ist es notwendig, die auf der Grundlage von mtDNA-Daten erstellte Phylogenie mit einer Phylogenie zu vergleichen, die auf der Basis von nukleären Daten erstellt wurde. Dieser Vergleich zwischen unabhängig voneinander evolvierenden Datensätzen sollte zeigen, ob die Ursache für die Polyphylie in Hybridisierung und Introgression zu finden ist.

Die von den analysierten *Altica*-Individuen gezeigte weitgehende interspezifische Übereinstimmung der Sequenzen des hier verwendeten Markers ITS2 lässt eine derartige Überprüfung der mittels mtDNA-Sequenzdaten rekonstruierten Phylogenie jedoch nur teilweise zu. Insbesondere können die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der einer Überprüfung besonders bedürfenden Art *A. lythri* mittels ITS2 nicht aufgelöst werden. Andererseits lässt sich für den Großteil der Arten anhand der nukleären ITS2-Sequenzen eine Bestätigung für die mittels mitochondrieller Daten rekonstruierten Verwandtschaftsverhältnisse erlangen. Allerdings gilt auch hier in manchen Fällen, dass die Auflösung auf der Grundlage der mtDNA-Sequenzen besser dargestellt ist.

Die geringe Auflösung des Clusters *A. aenescens* - *A. brevicollis* - *A. ericeti* - *A. longicollis* - *A. lythri* - *A.* sp. 1 zeigt sich in der Analyse der mitochondriellen DNA ebenso wie in der Analyse des nukleären Markers und spricht dafür, dass es sich um relativ junge Arten handelt. Es zeigen sich jedoch bei der Analyse des Markers ITS2 auch bedeutende Unterschiede zu den Ergebnissen der Stammbaumrekonstruktion auf der Grundlage der mitochondriellen DNA insofern, als dass ITS2 einige alternative Verwandtschaftsverhältnisse aufzeigt, die mit morphologischen Befunden besser vereinbar sind als die mittels mtDNA rekonstruierte Phylogenie. Erstens spricht die Analyse der ITS2-Sequenzen für eine nahe Verwandtschaft zwischen den unbestimmten Individuen der Arten *A.* sp. 1 und *A.* sp. 2, die nach ihrer mtDNA deutlich divergent erscheinen, morphologisch aber sehr ähnlich sind. Zweitens gruppiert die Analyse des nukleären Markers *A. aenescens* und *A. quercetorum* und trennt *A. aenescens* von der morphologisch extrem divergenten Art *A. ericeti*, die nach ihrer mitochondriellen DNA sehr nah miteinander verwandt erscheinen. Es erscheint jedoch unsicher, ob aufgrund der geringen Auflösung verlässliche Rückschlüsse auf die tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnisse gezogen werden können.

Die geringe bis fehlende Variabilität der ITS2-Sequenzen der verschiedenen *Altica*-Arten steht sehr im Widerspruch zu einer ganzen Reihe von Ergebnissen, die unter Verwendung

dieses Markers bei anderen Taxa erhalten wurden. Nicht nur Rekonstruktionen von Phylogenien auf Art- und Populationsebene, sondern auch der Einsatz bei Hybridisierungsexperimenten, zur Detektion kryptischer Arten und Unterarten sowie zur Analyse von Populationsstrukturen sollten aufgrund der normalerweise ausgeprägten Variabilität von ITS1 beziehungsweise ITS2 möglich sein (Vogler & DeSalle 1994, Miller et al 1996, Fabry et al.1999, Schulenburg et al. 1999, Bargues et al. 2000, Bargues et al. 2001, Mas-Coma et al. 2001, Bargues et al. 2003). In diesem Sinne stellt *Altica* offenbar eine Ausnahme dar. Die Invariabilität des eigentlich als hochgradig variabel bezeichneten Markers ITS2 wirft die Frage auf, auf welche Marker letztlich zurückgegriffen werden müsste, um eine Auflösung der Arten zu erreichen. Die Verwendung der AFLP-Methode oder die Analyse von Mikrosatelliten könnte hier Klarheit bringen und bilden Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen zur endgültigen Klärung der Ursache für die Polyphylie der Art *A. lythri* und zur besseren Auflösung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen schwach aufgelösten Arten.

Trotz des Fehlens eines eindeutigen Nachweises auf der Ebene der nukleären DNA bleibt die Hypothese, dass die Ursache für den nicht-monophyletischen Ursprung der mtDNA-Haplotypen der Art *A. lythri* interspezifische Hybridisierung und Introgression von mtDNA ist, die wahrscheinlichste Erklärung für die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse der Gattung *Altica* und insbesondere der Art *A. lythri*.

4.1.4. Hybridisierung als Ursache für Polyphylie

4.1.4.1. Zum Ursprung der bei *Altica lythri* gefundenen mitochondriellen Haplotypen

Über die Analyse eines schnell evolvierenden nukleären Markers und im Vergleich mit den phylogenetischen Daten der mtDNA kann im Idealfall festgestellt werden, welches die hybridisierenden Arten sind und woher die mitochondriellen Haplotypen stammen. Da die auf nukleären ITS2-Sequenzen basierende Phylogenie der Gattung *Altica* unglücklicherweise aufgrund der geringen Variabilität des Markers in diesem Bereich keine ausreichende Auflösung des interessierenden Clusters bietet, kann das Problem der Polyphylie jedoch zur Zeit nicht endgültig aufgeklärt werden. Zumindest kann jedoch festgehalten werden, dass die Analyse von ITS2 die dreiteilige Gruppierung von *A. lythri*, wie sie aufgrund der mtDNA vorliegt, nicht entsprechend wiedergibt. Die auf der Grundlage der ITS2-Sequenzen erfolgende Abgrenzung von fünf Individuen (A lyt 11, A lyt 20, A lyt 21, A lyt 24, A lyt 40) von den übrigen Individuen dieser Art korreliert

darüber hinaus nicht mit dem Auftreten eines bestimmten mtDNA-Haplotyps, sondern mit dem Fehlen einer Infektion mit *Wolbachia*. Ob dies ein umfassendes Phänomen ist oder ob hier tatsächlich ein Zusammenhang besteht, muss jedoch vorerst offen bleiben.

Da Introgression von mitochondrieller DNA mittels Hybridisierung und Rückkreuzung als wahrscheinlichste Hypothese zur Erklärung für die polyphyletischen Gruppen der Art *A. lythri* angesehen wird, ist die Diskussion über den Ursprung der mtDNA und somit die Klärung der Frage, welche Arten an Hybridisierungen beteiligt waren und welcher mtDNA-Typ die ursprüngliche Form darstellt, ein wichtiges Thema. Da bei *A. lythri* drei vollkommen unterschiedliche mtDNA-Haplotypen gefunden wurden, muss es zweimal zu Hybridisierung und Introgression gekommen sein. Darüber, zwischen welchen Arten Hybridisierung stattgefunden hat oder ob diese gegenwärtig stattfindet, und durch welchen Haplotyp die Art *A. lythri* eigentlich zu definieren ist, kann nur spekuliert werden.
Die einzige publizierte mtDNA-Sequenz der Art *A. lythri*, ein 820bp langer Abschnitt des *COI*-Gens (NCBI: DQ155917) eines Britischen Tieres, entspricht dem in der vorliegenden Untersuchung definierten Haplotyp HT2 dieser Art (ermittelt durch direkten Vergleich der Sequenzen; Daten nicht dargestellt). Dies beweist jedoch lediglich, dass dieser Haplotyp auch auf den Britischen Inseln vorkommt und vermag die Frage nach der ursprünglichen mtDNA-Variante nicht zu klären.
Für die Herkunft artfremder mtDNA kommen insbesondere solche Arten in Frage, die *A. lythri* auf der Ebene von Ökologie, insbesondere bezüglich des Habitats und der Nahrungspflanze, sowie auf Ebene der Morphologie ähnlich sind; grundsätzlich kommt aber natürlich jede Art in Frage, die zu *A. lythri* identische oder sehr ähnliche mtDNA aufweist. Betrachtet man die morphologischen Merkmale allein, stellen die Arten *A. aenescens* und *A. engstroemi* aufgrund der Merkmale der weiblichen Genitalmorphologie ähnliche Arten dar (Kangas & Rutanen 1992). Daneben wird die monophag auf *Vitis* vorkommende Art *A. ampelophaga* gewöhnlich als mit *A. lythri* besonders nah verwandt eingestuft und mitunter sogar als Unterart angesehen (Balcells 1953, 1954a, b). Diese Ansicht kann jedoch nach den hier vorliegenden molekularen Daten nicht bestätigt werden, denn *A. ampelophaga* weist zwar morphologisch große Ähnlichkeit mit *A. lythri* auf, zeigt jedoch auf molekularer Ebene klare Unterschiede, die eine Einstufung als Unterart keinesfalls rechtfertigen. Die Daten des nukleären Markers ITS2 lassen bezüglich der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen *A. ampelophaga* und *A. lythri* keine eindeutige Interpretation zu, zeigen jedoch zumindest für zwei Individuen der Art *A. ampelophaga*

klar, dass eine nahe Verwandtschaft zwischen den beiden Arten nicht bestätigt werden kann. Gegen diese Interpretation spricht lediglich die verwandtschaftliche Positionierung des dritten Individuums, das eine zu vielen *A. lythri*-Individuen identische ITS2-Sequenz aufweist.

Die morphologische Ähnlichkeit zwischen *A. lythri* und *A. engstroemi* dagegen lässt sich sehr gut mit den auf mtDNA-Sequenzen beruhenden Daten in Übereinstimmung bringen, sofern man annimmt, dass die von der mitochondriellen DNA aufgedeckten Verwandtschaftsbeziehungen zwischen *A. engstroemi*, *A. quercetorum* sowie *A. lythri* des Haplotyps HT3 die tatsächlichen phylogenetischen Beziehungen zwischen diesen Arten widerspiegeln.

Ähnlich in Hinblick auf Morphologie und Fraßpflanze ist die Art *A. impressicollis*. Diese Art findet man auf *E. hirsutum* vergesellschaftet mit *A. lythri* (wenn auch erheblich seltener als diese). So fand sich auch das in dieser Untersuchung enthaltene Exemplar unter den Individuen einer Aufsammlung zahlreicher *A. lythri*. Die Vermutung einer nahen Verwandtschaft zwischen den beiden Arten lässt sich jedoch weder aufgrund der Analyse der mitochondriellen noch der nukleären Sequenzdaten bestätigen. *A. impressicollis* ist tatsächlich mit den morphologisch stark abweichenden Arten *A. carinthiaca*, *A. helianthemi*, *A. palustris* und *A. tamaricis* deutlich näher verwandt; nach den mitochondriellen Daten besteht die nächste Verwandtschaft zu der Art *A. birmanensis* (Individuum aus Taiwan). Da *A. impressicollis* somit eine von *A. lythri* stark abweichende mtDNA besitzt, kommt sie für die Klärung der Herkunft einer artfremden mtDNA-Sequenz nicht in Betracht.

Zieht man Schlussfolgerungen bezüglich hybridisierender Arten und der Herkunft der bei *A. lythri* nachgewiesenen mtDNA-Haplotypen aus der Übereinstimmung von mtDNA-Sequenzen zwischen unterschiedlichen *Altica*-Arten, so scheint es naheliegend, anzunehmen, dass der häufige Haplotyp HT1 (und hierzu auch HT1*; zur weiteren Diskussion bezüglich dieser beiden Varianten vergleiche Abschnitt 4.2.5) den ursprünglichen Haplotyp der Art *A. lythri* darstellt, denn diese Variante weist keine Ähnlichkeit mit mtDNA-Sequenzen irgendeiner anderen Art auf. Zudem ist diese Gruppe deutlich von allen nächstverwandten Individuen abgegrenzt. Wenn dies allerdings der Fall ist, ergibt sich die Frage, wie das vollständige Fehlen von männlichen Tieren dieses Haplotyps erklärt werden kann. Da Männchen, wie gezeigt werden konnte, essentiell für die Reproduktion sind, müsste sich ein so deutlicher Mangel nachteilig auf eine Population

auswirken. Unabhängig von den nicht eindeutigen Ergebnissen der phylogenetischen Analyse können bezüglich des deutlichen Weibchenüberschusses verschiedene Überlegungen angestellt werden. Nach eingehender Betrachtung der Ergebnisse der geographischen Analyse der Haplotypenverteilung und der Verpaarungsexperimente soll hierauf eingegangen werden (vergleiche Abschnitt 4.2.5).

Die Haplogruppe HT2 stellt einen ganz anderen Fall dar, denn hier sind Männchen ebenso häufig wie Weibchen. Innerhalb der Gruppierung, die von den Arten *A. aenescens, A. brevicollis, A. ericeti*, *A. longicollis* und *A.* sp. 1 sowie *A. lythri* des Haplotyps HT2 gebildet wird, finden sich stark ausgeprägte Sequenzähnlichkeiten zwischen diesen Arten. Hier ist die Auflösung der Verwandtschaftsverhältnisse allerdings auch so unbefriedigend gering, dass für die Herkunft der mtDNA mehr als eine Art in Frage käme.

Obwohl zudem die Auflösung der Verwandtschaftsbeziehungen auf der Grundlage von ITS2 unerwartet gering ist und die weitgehend fehlenden Sequenzunterschiede dem widersprechen, was dieser Marker oder auch der gleichwertige Marker ITS1 normalerweise an Variabilität aufweist, ergeben sich für diese Gruppe zumindest einige Hinweise bezüglich der Herkunft von mtDNA-Haplotypen, und Unterschiede, die tatsächlich als Nachweis von Hybridisierung gedeutet werden könnten. Das Ergebnis, dass die mit *A.* sp. 2 bezeichneten Individuen auf der Grundlage der ITS2-Sequenzen so nah mit *A.* sp. 1 verwandt ist, dass es sich um dieselbe Art handeln könnte, widerspricht klar den Resultaten der Analyse der mtDNA, scheint jedoch begründet, da zwischen den Taxa eine klare morphologische Ähnlichkeit besteht. Die mitochondrielle DNA dagegen lässt eine nahe Verwandtschaft zwischen *A.* sp. 1 und *A. lythri* des Haplotyps HT2 erkennen. Es scheint daher, als stamme die mitochondrielle DNA der Art *A.* sp. 1 von *A. lythri* oder alternativ von *A. longicollis*, denn zwischen den mtDNA-Sequenzen dieser Arten ist praktisch keine Differenzierung vorhanden.

Diejenigen Individuen der Art *A. lythri*, bei denen der weniger häufige Haplotyp HT3 nachgewiesen werden konnte, bilden ebenfalls eine klar abgegrenzte Haplogruppe; die nächstähnlichen mtDNA-Sequenzen stammen von *A. engstroemi*. Diese nahe Verwandtschaft wird auf Ebene der nukleären DNA bestätigt. Da sich unter den anderen Arten keine zu HT3 identischen oder zumindest sehr ähnlichen mtDNA-Sequenzen finden und die Gruppe durch ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis gekennzeichnet ist, könnte es sich hier also um den ursprüngliche mtDNA-Haplotyp der Art *A. lythri* handeln.

Nach der derzeitigen Datenlage kann nicht geklärt werden, woher die bei *A. lythri* nachgewiesenen Haplotypen stammen. Unter den analysierten Arten finden sich wenige Ansatzmöglichkeiten, doch kann dieses Problem darauf beruhen, dass der Datensatz unvollständig ist. Einige mittel- und nordeuropäische Arten konnten nicht analysiert werden, da kein Material zur Verfügung stand (Tab. 40).

Tab. 40 Mittel- und nordeuropäische Arten der Gattung *Altica*, von denen bislang keine phylogenetischen Daten vorliegen. Angaben zum Vorkommen und zur Fraßpflanze zusammengestellt nach Mohr (1966), Siede (1998) und Fauna Europaea (http://www.faunaeur.org).

Art	Vorkommen	Fraßpflanze
A. carduorum GUÉRIN-MÉNEVILLE, 1858	Südeuropa; in Deutschland nur am Kaiserstuhl	*Cirsium*-Arten
A. chamaenerii HÅKAN LINDBERG, 1926	Nordeuropa; südlich bis zum Kaspischen Meer; Slowakei	*Epilobium angustifolium*
A. cornivorax KRÁL, 1969	Südosteuropa, Wiener Becken	*Cornus sanguinea*
A. jarmilae KRÁL, 1979	Südosteuropa (Griechenland, Bulgarien); selten	*Epilobium hisutum*, *E. tetragonum*

Möglicherweise findet sich unter den fehlenden Arten der Ursprung der fremden mtDNA, die bei *A. lythri* gefunden wurde. Von den in Tab. 40 genannten mitteleuropäischen Arten erschient eine Art besonders vielversprechend: *A. jarmilae* kommt auf der gleichen Fraßpflanze vor wie *A. lythri*, und nach den Abbildungen bei Siede (1998) gleichen sich beide Arten anhand der Genitalmorphologie.

4.1.4.2. Weitere Hinweise auf interspezifische Hybridisierung

Die drei Individuen der Art *A. aenescens* bilden auf der Grundlage ihrer mitochondriellen DNA keine monophyletische Gruppe, sind jedoch bezüglich ihrer ITS2-Sequenzen untereinander identisch (die Basenabfolge der ITS2-Sequenz entspricht jedoch gleichzeitig derjenigen von *A. quercetorum*). Es scheint also, als enthielte auch der Genpool von *A. aenescens* mitochondrielle DNA einer anderen Art. Auffällig ist in jedem Fall, dass zwei Individuen auf der Basis ihrer mitochondriellen DNA den Individuen der Art *A. ericeti*, die dem gleichen Fundort entstammen (*A. aenescens* von *Betula*, *A. ericeti* von *Erica tetralix*; die Fundstellen liegen etwa 20 Meter voneinander entfernt), ähnlicher sind als dem dritten Individuum (A aen 1). Morphologisch gesehen macht diese Aufteilung keinen Sinn; *A. aenescens* und *A. ericeti* weisen keinerlei Ähnlichkeit zueinander auf. Hier könnte sich eine tiefergehende Analyse beider Arten möglicherweise als aufschlussreich erweisen.

4.2. Analyse der *Wolbachia*-Infektion bei *Altica*

4.2.1. *Wolbachia*-Infektionsstatus, Infektionsraten und Infektionstypen

Es hat sich gezeigt, dass die heimischen Arten der Gattung *Altica* zu einem hohen Prozentsatz (soweit aus den erhobenen Daten zu ermitteln) mit *Wolbachia* der Stämme wA1, wA2 und wB infiziert sind und dass die nachgewiesenen Bakterien zu den beiden Supergroups A und B gehören, die bei Insekten besonders häufig vorkommen (Werren et al. 2008). Natürlich ist es nicht möglich, auf der Grundlage des teilweise sehr geringen Stichprobenumfanges auf die Situation jeweils innerhalb der gesamten Art Rückschlüsse zu ziehen, insbesondere in Fällen, in denen nur Einzelindividuen zur Verfügung standen. Auch können sich die Infektionsfrequenzen zwischen verschiedenen Populationen einer Art natürlich unterscheiden, wie einige stichprobenartige Analysen bei *A. lythri* zeigen. Hier bietet sich eine reichhaltige Ansatzstelle für weitergehende Untersuchungen.

Schlussfolgernd aus den Ergebnissen ist anzunehmen, dass *Wolbachia*-Infektionen innerhalb der Unterfamilie Alticinae verbreitet, zumindest aber keinesfalls auf die Gattung *Altica* beschränkt sind. Dies zeigt nicht nur der Nachweis von *Wolbachia* bei den Individuen der Arten *Hermaeophaga mercurialis* und *Podagrica fuscipes*, die als Außengruppe Verwendung fanden; auch eine Untersuchung der nach Nordamerika eingeführten Flohkäferart *Aphthona nigriscutis* zeigte eine hohe *Wolbachia*-Infektionsrate innerhalb bestimmter mtDNA-Haplogruppen (Roehrdanz et al. 2006). Aktuelle Analysen (A. Pfaff, Bachelorarbeit 2010) weisen hohe *Wolbachia*-Infektionsraten auch in einem umfangreichen Sequenzdatensatz bei der Flohkäferart *Longitarsus melanocephalus* nach.

4.2.2. *Wolbachia* bei *Altica lythri*

Umfangreiche Ergebnisse zu Infektionsraten und Infektionstypen bietet die vorliegende Untersuchung für die Art *A. lythri*. Die Daten lassen auf eine hohe Infektionsrate schließen, zeigen jedoch auch, dass die Infektionsfrequenzen sich offenbar zwischen den unterschiedlichen mtDNA-Haplogruppen unterscheiden. Die phylogenetische Analyse zeigt dies recht deutlich: Während alle Individuen des Haplotyps HT1 mit *Wolbachia* infiziert waren, ist bei keinem der Tiere des Haplotyps HT1* eine Infektion nachweisbar (dieses Muster bestätigt sich in der Analyse der Infektionstypen der für die Verpaarungsexperimente verwendeten Weibchen[1]). Bei den Haplogruppen, die die Tiere der Haplotypen HT2 beziehungsweise HT3 umfassen, liegen die Infektionsfrequenzen

[1] mit Ausnahme eines Weibchens des Haplotyps HT1*, bei dem eine *Wolbachia*-Infektion nachgewiesen, der Stamm jedoch nicht determiniert werden konnte.

dagegen jeweils bei vergleichsweise geringen 50%. Derartige Polymorphismen der Infektionsrate können ihre Ursache in unvollständiger maternaler Transmission der Bakterien von Weibchen zu ihren Nachkommen haben oder aber in einer Eliminierung der Bakterien aufgrund hoher Umgebungstemperaturen (Hoffmann et al. 1986, Van Oijnen & Breeuwer 1999). Weitere Ursachen sind möglicherweise hohe Individuendichten und Mangelernährung des Wirts (Clancy & Hoffmann 1998, Hoffmann et al. 1998), Diapause (Perrot-Minnot et al. 1996) und natürlich vorkommende Antibiotika (Stevens & Wicklow 1992, Stouthamer et al. 1999). Durch unvollständige Transmission oder durch Eliminierung der Bakterien sind einige Tiere beziehungsweise deren Nachkommen frei von einer Infektion. Daher sind nicht infizierte Individuen Abkömmlinge infizierter oder ehemals infizierter Weibchen und tragen folglich denjenigen Haplotyp, der für infizierte Tiere typisch ist (Jiggins 2003). Diese Erklärungsmöglichkeiten können für die reduzierte Infektionsrate der beiden letztgenannten Haplogruppen angeführt werden; hier weisen infizierte Individuen den gleichen Haplotyp auf wie nicht infizierte Individuen. Das Fehlen von *Wolbachia* bei Individuen des Haplotyps HT1* kann dagegen anders interpretiert werden; dies soll in Abschnitt 4.2.5 näher erläutert werden.

Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass PCR-basierte Methoden zum Nachweis einer Infektion mit *Wolbachia* fehleranfällig sind. Mittels Amplifikation eines *Wolbachia*-Gens erbrachte negative Resultate können also entweder ein tatsächliches Charakteristikum der Tiere oder aber ein falsch negatives Ergebnis darstellen, das durch Versagen der PCR erzeugt wurde. Diesem Problem kann durch mehrere Maßnahmen begegnet werden. Aufgrund von sehr unterschiedlichen Infektionsraten innerhalb einer Art findet man eine mit Zunahme der Größe der Stichprobe steigende relative Anzahl infizierter Individuen (Tagami & Miura 2004, Sun et al 2007). Außerdem ist es möglich, durch Verwendung einer Proofreading-Polymerase und einer hohen Zyklenzahl die Detektion von *Wolbachia* zu verbessern (Hoy et al. 1999, Jeyaprakash & Hoy 2000). Bei Anwendung dieser Methoden bei einer anhand des *wsp*-Gens durchgeführten Analyse konnte eine im Vergleich zur Verwendung von Standard-PCR-Bedingungen und des *ftsZ*-Gens 4,5mal höhere Infektionsrate gefunden werden; bei 76% von 62 untersuchten Arthropodenarten wurde das Vorhandensein von *Wolbachia* nachgewiesen (Jeyaprakash & Hoy 2000). Allerdings sind auch diese Ergebnisse wiederum mit Vorsicht zu genießen, denn aufgrund von Kontaminationen könnte es leicht zu falsch positiven Reaktionen kommen. Idealerweise sollten zusätzlich zur diagnostischen PCR andere Methoden wie etwa histologische Untersuchungen von Wirtsgewebe per *in situ*-Hybridisierung und

Elektronenmikroskopie oder Western Blot zur Detektion von *Wolbachia* Verwendung finden (Dobson et al. 1999, Ijichi et al. 2002).

4.2.3. Unabhängiger Erwerb von *Wolbachia*-Infektionen anstelle von Coevolution

Die Phylogenien von Wirt und Parasit stimmen im System *Altica*-*Wolbachia* bezüglich der jeweils wiedergegebenen Verwandtschaftsverhältnisse nicht überein. Insbesondere lässt sich für die Art *A. lythri* festhalten, dass die nahe Verwandtschaft zwischen den Stämmen wA1 und wA2 von den entsprechend infizierten Tieren über die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb des mtDNA-Datensatzes nicht wiedergegeben wird. Dieses Ergebnis spricht zumindest im Falle der HT1-wA1- und der HT3-wB-Gruppierung gegen eine langfristige Koevolution von Wirt und Bakterium und für einen unabhängigen Erwerb der Infektion mit wB durch *A. engstroemi*, *A. quercetorum* und *A. lythri* (HT3).

Die Bestimmung der Infektionstypen über die Sequenzierung des *Wolbachia*-Gens *ftsZ* zeigt, dass die beiden bei der phylogenetischen Analyse der mitochondriellen DNA als Außengruppe dienenden Individuen der Arten *H. mercurialis* beziehungsweise *P. fuscipes* zwei unterschiedliche *Wolbachia*-Stämme aufweisen, die jeweils den bei *Altica* nachgewiesenen Stämmen wA1 (bei *P. fuscipes*) entsprechen beziehungsweise wB (bei *H. mercurialis*) ähneln. Umgekehrt weisen die beiden Individuen der Art *A. quercetorum* zwar sehr ähnliche mtDNA-Sequenzen auf, sind jedoch mit sehr unterschiedlichen *Wolbachia*-Stämmen infiziert (wA1 beziehungsweise wB). Auch dies sind Beispiele dafür, dass Wirt-*Wolbachia*-Assoziationen über einen evolutionären Zeitraum gesehen nicht stabil sind, da Infektionen sowohl verloren gehen als auch neu erworben werden können. Horizontale Weitergabe, und nicht Koevolution, scheint bei Insekten und anderen Arthropoden, ganz im Gegensatz zur Situation bei Nematoden, tatsächlich einen ganz wesentlichen Faktor darzustellen (Werren et al. 1995b, Zhou et al. 1998, Riegler et al. 2005, Baldo et al. 2006a,b, Baldo et al. 2008).

Anhand dieses und des Ergebnisses der kombinierten Analyse mit *Altica*-*Wolbachia*-Sequenzen unter Einbeziehung zahlreicher weiterer *Wolbachia*-*ftsZ*-Sequenzen einer großen Anzahl unterschiedlicher Wirte wird deutlich, dass keiner der bei *Altica* gefundenen *Wolbachia*-Stämme einzigartig für die Gattung ist; dieses Ergebnis spricht also gegen eine Coevolution von Wirt und Parasit. Bei *Altica* konnten jedoch zumindest bei sehr nah verwandten Arten mit hochgradig ähnlicher mtDNA auch ähnliche *Wolbachia* nachgewiesen werden - etwa im Falle der Individuen der Art *A. lythri* des Haplotyps HT2

und ihrer nah verwandten Arten. Dies spricht zumindest für eine vorübergehend stabile Assoziation einer Art mit einem bestimmten *Wolbachia*-Stamm.

Da Infektionen im Laufe von Artbildungsprozessen verloren gehen, andere Infektionstypen neu erworben oder ersetzt werden können, ist eine Coevolution zwischen Wirt und *Wolbachia* ohnehin unwahrscheinlich und kann nur selten nachgewiesen werden - ein *Wolbachia*-Stamm überdauert nicht lang genug in einem Wirtstaxon, um gemeinsam mit diesem zu divergieren (Zhou et al. 1998, Vavre et al. 1999, Engelstädter & Hurst 2009). Daher kommt es eher selten vor, dass nah verwandte Wirtsarten auch nah verwandte Bakterien-Stämme aufweisen (Werren et al. 1995b, Haine & Cook 2005, Baldo et al. 2006a, b).

Normalerweise wird eine *Wolbachia*-Infektion vertikal, also von einer Generation an die nächste, von Weibchen an deren Nachkommen (maternal) weitergegeben; paternale Weitergabe kommt offenbar so gut wie nie vor (Hoffmann & Turelli 1988, Hoffmann et al. 1990). Wenn aber die Phylogenien von Wirt und Parasit dennoch nicht übereinstimmen, muss es zu horizontaler Weitergabe der Bakterien gekommen sein, also zu einem Transfer zwischen den Taxa. Dieser Vorgang kann zumindest indirekt häufig nachgewiesen werden, denn viele Analysen haben gezeigt, dass nah verwandte *Wolbachia*-Stämme entfernt verwandte Wirte infizieren (O'Neill et al. 1992, Rousset et al. 1992, Schilthuizen & Stouthamer 1997, Heath et al. 1999, Vavre et al. 1999, Baldo et al. 2008, Raychoudhury et al. 2008, Stahlhut et al. 2010).

Auch wenn die Mechanismen, die einem solchen horizontalen Transfer zugrunde liegen, weitgehend unbekannt sind, existieren doch einige Hinweise auf mögliche Übertragungswege. So konnte gezeigt werden, dass Arthropoden, die sich räuberisch von anderen Arthropoden ernähren, viel öfter mit *Wolbachia* infiziert sind als sich pflanzlich ernährende Taxa. Ein Transfer zwischen Individuen, die in engem Kontakt zueinander leben, etwa, weil sie dieselbe Nahrungsquelle nutzen, scheint ebenfalls möglich zu sein (Rigaud & Juchault 1995, Huigens et al. 2000). Eine Infektion ist offenbar über den Kontakt mit Hämolymphe möglich (Rigaud et al 1991, Juchault et al. 1994, Rigaud & Juchault 1995, Lawson et al. 2001); zudem konnte experimentell gezeigt werden, dass *Wolbachia* außerhalb des Wirtes eine genügend lange Zeit lebensfähig ist, um, etwa von der Oberfläche eines Blattes, von einem anderen potentiellen Wirt aufgenommen zu werden (Sintupachee et al. 2006). Tatsächlich sind die Bakterien in abgestorbenen Wirtszellen beziehungsweise außerhalb des Wirts für eine gewisse Zeit (eine Woche bei Raumtemperatur) lebensfähig (Rasgon et al. 2006, Fallon 2008). Zudem ist *Wolbachia* in

der Lage, Zellmembranen zu queren (Frydman et al. 2006), so dass viele mögliche Wege existieren, auf denen ein neuer Wirt infiziert werden kann.
Da die Bakterien auch in den Speicheldrüsen und im Kot ihrer Wirte nachgewiesen wurden (Dobson et al. 1999, Mitsuhashi et al. 2002, Espino et al. 2009), bietet sich ein umfangreiches Szenario an Übertragungswegen, so etwa auch über Insekten, die über stechend-saugende Mundwerkzeuge verfügen (Sintupachee et al. 2006). Weitere potentielle Überträger sind Parasitoide, die die Bakterien von einem Wirt auf einen anderen übertragen können (Schilthuizen & Stouthamer 1997, Heath et al. 1999, Vavre et al. 1999, Cordaux 2001, Huigens et al. 2004). Es muss allerdings zumindest ein Teil der parasitierten Wirte überleben, um selbst zu einer infizierten Imago zu werden - oder der Parasitoid selbst wird infiziert, etwa indem seine sich im infizierten Wirt entwickelnden Nachkommen ihrerseits von den Bakterien befallen werden.

4.2.4. Einschränkung von Interpretationen bezüglich der Effekte von *Wolbachia*

4.2.4.1. Mehrfachinfektionen

So wie sich Individuen offenbar relativ leicht mit *Wolbachia* infizieren können, können sich auch bereits infizierte Tiere ebenso mit weiteren Stämmen infizieren. Horizontaler Transfer von *Wolbachia*-Stämmen beinhaltet also als weitere Konsequenz die Möglichkeit, dass es zu Mehrfachinfektionen kommen kann.
Bei vielen Insekten wurden in der Vergangenheit bereits Doppel- und sogar Dreifachinfektionen nachgewiesen (James et al. 2002, Kikuchi & Fukatsu 2003, Mouton et al. 2004, Kondo et al. 2005, Narita et al. 2007). Mehrfachinfektionen verkomplizieren alle Annahmen, die bezüglich der Wechselwirkungen zwischen Wirt und Parasit gemacht werden, denn sie zeigen Merkmale von Interaktionen und Dominanz zwischen den unterschiedlichen Stämmen in ein und demselben Wirt. Zudem ergeben sich ganz neue Möglichkeiten für die Induktion verschiedener Formen cytoplasmatischer Inkompatibilität, da sie gewöhnlich zu bidirektionaler Inkompatibilität zwischen den doppelt infizierten Individuen und einfach infizierten Individuen führen (Perrot-Minnot et al. 1996). Andererseits aber können doppelt infizierte Weibchen auch mit jedem Männchen unabhängig von dessen Infektionsstatus kompatibel sein (James et al. 2002) und Doppelinfektionen werden sich in einer Population ausbreiten (Bordenstein & Werren 1998). Bei *Nasonia* sind Doppelinfektionen bidirektional inkompatibel und verhindern Genfluss zwischen Arten (Bordenstein & Werren 1998).

Somit wird deutlich, dass Rückschlüsse auf Verbindungen zwischen *Wolbachia*-Stamm und dem beim Wirt hervorgerufenen Phänotyp zusätzlich erschwert werden, wenn nicht gesichert ist, ob der bei einem Wirt nachgewiesene *Wolbachia*-Stamm tatsächlich der einzige ist. Für den vorliegenden Datensatz kann jedoch mindestens für *A. lythri* aufgrund der uneingeschränkten Koppelung zwischen *Wolbachia*-Stamm und mtDNA-Haplotyp von Einfachinfektionen jedes Individuums ausgegangen werden; andernfalls hätten rein statistisch gesehen auch gelegentlich Abweichungen von dieser Assoziation festgestellt werden müssen.

4.2.4.2. Horizontaler Gentransfer und Integration von Genen ins Wirtsgenom

Die Übertragung von Genom- oder Genabschnitten zwischen unterschiedlichen *Wolbachia*-Stämmen durch Rekombination sowie der Transfer von *Wolbachia*-Genen oder sogar ganzen Genomen in das Genom des Wirts sind keine seltenen Phänomene (Werren et al. 1995b, Jiggins 2001b, Werren & Bartos 2001, Reuter & Keller 2003, Baldo et al 2005, Malloch & Fenton 2005, Dunning Hotopp et al. 2007) - *Wolbachia*-Genome sind Chimären (Baldo et al 2006a). Die Bakterien weisen zudem eine hohe Befallsrate mit Phagen auf, welche oft lateral von einem Stamm zum nächsten weitergegeben werden (Bordenstein & Wernegreen 2004, Gavotte et al. 2004). Auch auf diesem Wege ist es möglich, dass Gene von einem Bakterienstamm in einen anderen gelangen.

Diese Mechanismen stellen ein wesentliches Problem bei der Analyse von Phylogenien der Bakterien dar, da es, insbesondere bei Betrachtung nur eines Genabschnitts, zu fehlerhaften Ergebnissen und fehlgeleiteten Interpretationen kommen kann. Unvereinbarkeit von auf verschiedenen DNA-Abschnitten beruhenden Phylogenien ist die Folge. Zudem kann ein Bild erzeugt werden, das man fälschlicherweise für einen Nachweis horizontalen Transfers eines *Wolbachia*-Stammes zwischen zwei Wirtstaxa halten könnte (Jiggins et al. 2001b).

Das sehr variable *wsp*-Gen ist, im Vergleich zu anderen *Wolbachia*-Genen wie zum Beispiel *ftsZ* (Baldo et al. 2006a, b), oftmals besonders stark von Rekombination als Folge von Transformation, Transduktion und Konjugation betroffen (Werren & Bartos 2001, Reuter & Keller 2003, Baldo et al 2005, Malloch & Fenton 2005, Werren et al. 2008) - worauf folglich möglicherweise ein großer Teil der Variabilität beruht. Zudem scheint *wsp* starker positiver Selektion sowie Interaktionen zwischen Wirt und Symbiont zu unterliegen - offenbar vermittelt es die Interaktion zwischen Wirt und Bakterium (Schulenburg 2000, Baldo et al. 2002, Werren et al. 2008). Um diesen Problemen zu begegnen, wurde das sogenannte "Multilocus Sequence Typing system" (MLST) entwickelt, das auf der

Verwendung von Fragmenten der fünf *Wolbachia*-Gene *coxA*, *fbpA, ftsZ*, *gatB* und *hcpA* beruht (Baldo et al 2006b, Paraskevopoulos et al. 2006).

Es soll hier jedoch betont werden, dass *wsp* für derartige Untersuchungen nicht gänzlich ungeeignet ist. In der vorliegenden Arbeit wurde *wsp* verwendet, um den Infektionsstatus und den Infektionstyp der für die Verpaarungsexperimente eingesetzten Weibchen zu analysieren. Da in allen Fällen die Assoziation zwischen einem bestimmten Stamm und einem bestimmten mtDNA-Haplotyp bestätigt werden konnte, ist eine fehlerhafte Interpretation der Ergebnisse als unwahrscheinlich anzusehen (Reuter & Keller 2003). Dies gilt nicht nur für die Analysen auf der Grundlage der *wsp*-, sondern auch der *ftsZ*-Sequenzen.

4.2.5. Hinweise auf von *Wolbachia* verursachte mtDNA-sweeps

Die Schlußfolgerungen über Coevolution zwischen Wirt und Parasit (siehe Abschnitt 4.2.3) berühren in keiner Weise die Betrachtungen über die besonderen Merkmale der Gattung *Altica* im Allgemeinen und der Art *A. lythri* im Besonderen.

Innerhalb der Gattung *Altica* ist mit Ausnahme der Arten *A. lythri* und *A. quercetorum* eine Art immer nur mit einem *Wolbachia*-Stamm infiziert, doch besteht zwischen beiden Fällen ein wesentlicher Unterschied. Bei *A. quercetorum* weisen die beiden analysierten Individuen zwar den gleichen mtDNA-Typ auf, sind jedoch mit zwei verschiedenen *Wolbachia*-Stämmen, wA1 beziehungsweise wB, infiziert. Es ist anzunehmen, dass diese Populationen (sie liegen etwa 300km voneinander entfernt) ihre Infektionen jeweils unabhängig voneinander erlangten, oder, alternativ, dass in einer der beiden Populationen der ursprüngliche Stamm durch einen anderen ersetzt wurde.

Für die Art *A. lythri* lässt die auf der Grundlage von *ftsZ*-Sequenzen rekonstruierte Phylogenie erkennen, dass in den Populationen drei unterschiedliche *Wolbachia*-Stämme nebeneinander existieren. Der Nachweis des Stammes wB sowie des dritten mtDNA-Haplotyps HT3 stellt hierbei zu den bereits bekannten Daten einen neuen Befund dar. Insbesondere interessant ist die konstante Assoziation zwischen mtDNA-Haplotyp und *Wolbachia*-Stamm (abgesehen vom offenbar infektionsfreien Haplotyp HT1*). Das Muster ist verblüffend, jedoch erklärbar, und führt andererseits auch zu neuen, umfangreichen Fragestellungen.

Die *Wolbachia*-Infektion ist bei *A. lythri* ganz offensichtlich nicht zufällig auf die unterschiedlichen mtDNA-Haplogruppen verteilt. Die Assoziation ist mit der Koppelung der Mitochondrien mit je einem bestimmten *Wolbachia*-Stamm zu erklären, dir durch die

gemeinsame, vertikale Weitergabe beider Faktoren durch den weiblichen Wirt bedingt ist. Die stabile Assoziation jedes mtDNA-Haplotyps mit je einem bestimmten *Wolbachia*-Stamm legt außerdem nahe, dass es im Falle des *ftsZ*-Gens keine Rekombinationsereignisse zwischen unterschiedlichen Stämmen gegeben hat oder gibt, welche andernfalls die Ergebnisse verfälschen würden. Zudem weist sie darauf hin, dass eine horizontale Weitergabe der Symbionten zumindest zwischen den untersuchten mitochondriellen Linien nicht stattfindet (Reuter & Keller 2003).

Die maternale und somit gekoppelte Weitergabe sowohl der mtDNA als auch der Bakterien bietet aber nicht nur eine Erklärung für die auf die Zuordnung jedes Haplotyps zu einem bestimmten Infektionstyp bezogene Übereinstimmung beider Phylogenien. Wie bereits erwähnt, kann eine Infektion mit cytoplamatische Inkompatibilität auslösenden *Wolbachia* die Ausbreitung einer durch Hybridisierung und Introgression in eine Art neu eingeführte mtDNA-Variante dadurch begünstigen, dass die Bakterien infizierten weiblichen Wirten einen Selektionsvorteil gegenüber nicht infizierten Weibchen verschaffen. Da infizierte Weibchen beziehungsweise deren Nachkommen nicht von cytoplasmatischer Inkompatibiliät betroffen sind, sind alle Paarungen unabhängig vom Infektionsstatus des Männchens kompatibel. Im Falle von *Wolbachia*-Infektionen, die zu Male-Killing führen, besteht dieser Selektionsvorteil für infizierte Weibchen beziehungsweise für das Bakterium möglicherweise in einer Verminderung von Konkurrenz unter den Nachkommen des Wirts, deren Anzahl um 50% reduziert ist (Dyson & Hurst 2004, Jaenike 2007).
Die Ausbreitung einer neuen *Wolbachia*-Infektion in einer Wirtspopulation bedingt aufgrund der Kopplung beider Elemente einen sogenannten „selective sweep“ derjenigen mtDNA-Variante, die mit der initialen Infektion assoziiert ist (Turelli & Hoffmann 1991, Werren 1997c, Ballard & Whitlock 2004, Hurst & Jiggins 2005, van Opijnen et al. 2005, Raychoudhury et al. 2010). Gelangt die mitochondrielle DNA einer Art mittels Hybridisierung, Rückkreuzung und Introgression in eine andere Art, wird der ursprüngliche, artspezifische mtDNA-Typ durch einen neuen, von einer anderen Art stammenden Haplotyp ersetzt. Dies funktioniert natürlich nur dann, wenn sich die Bakterien in der Population erfolgreich ausbreiten, was zumindest dann geschehen sollte, wenn, wie oben diskutiert, eine Infektion dem Wirt einen Selektionsvorteil bietet. Dies ist der Grund, warum *Wolbachia* zumindest theoretisch in der Lage sein sollte, sich in einer neu infizierten Population schnell auszubreiten. Obwohl theoretische Analysen vorhersagen, dass CI-induzierende Wolbachien vom Moment der Erstinfektion an oder aber

nach Überschreiten einer kritischen Schwelle in einer Population ihrer Wirte sich schnell bis zur Fixierung ausbreiten werden, wurde dieses Muster in natürlich vorkommenden Populationen nicht gefunden; stattdessen findet man regelmäßig intermediäre Infektionsfrequenzen (Hoffmann et al. 1990, Turelli & Hoffmann 1991, Turelli & Hoffmann 1995, Hoffmann & Turelli 1997, Jiggins et al. 2002, Vala et al. 2004). Die Mechanismen, die dazu beitragen, dass eine *Wolbachia*-Infektion in einer Population eines Wirtes nicht zur Fixierung gelangt, wurden in Abschnitt 4.2.2 bereits diskutiert.

Wenn infizierte Individuen einer Art einen anderen mtDNA-Haplotyp aufweisen als nicht infizierte Individuen derselben Art, ist dies möglicherweise ein Hinweis auf einen von *Wolbachia* verursachten mtDNA-sweep. Aufgrund der Assoziation von Mitochondrien und *Wolbachia* weisen infizierte Tiere einen anderen Haplotyp auf als nicht infizierte Individuen. Hinweise auf ein derartiges Muster finden sich in der Gruppierung des mtDNA-Haplotypen HT1 und der Variante HT1*. Individuen der Art *A. lythri*, die den Haplotyp HT1* aufweisen, sind (abgesehen von einer bereits erwähnten Ausnahme) nicht mit *Wolbachia* infiziert; dieses Muster könnte also die Folge eines "selective sweep" sein. Somit könnte es sich bei den Tieren mit dem Haplotyp HT1* um Vertreter einer ursprünglich nicht infizierten Population handeln, bei der die Ersetzung des ursprünglichen Haplotyps durch einen anderen, also durch HT1, derzeit geschieht.

4.3. Geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung bei *Altica lythri*

4.3.1. Geschlechterverhältnisse

Die umfassende geographische Analyse von Populationen der Art *A. lythri* zeigt sehr deutlich, in welchem Umfang diese Art von dem verschobenen Geschlechterverhältnis betroffen ist. Andeutungen bezüglich fehlender oder seltener Männchen sowie einige wenige Spekulationen über die Ursache für dieses Phänomen finden sich in der spärlichen Literatur zu der wenig untersuchten Gattung, genauere Analysen jedoch wurden jedoch offenbar bisher nicht durchgeführt. Hier konnte erstmalig gezeigt werden, dass Männchen in den meisten, nicht jedoch in allen Populationen selten bis sehr selten sind, und dass ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und dem mitochondriellen Haplotyp dieser Tiere besteht.

Die ungleiche Geschlechterverteilung mit extrem vielen Weibchen und sehr wenigen Männchen ist, wie sich gezeigt hat, in nahezu allen Populationen deutlich ausgeprägt. Lediglich zwei Populationen wiesen ein Geschlechterverhältnis auf, das dem theoretisch stabilen Verhältnis von 50% Männchen und 50% Weibchen entspricht.

Es existiert, geographisch betrachtet, kein erkennbarer gradueller Verlauf bezüglich des Anteil männlicher Individuen am Gesamtumfang der Populationen, sondern Populationen mit einem vergleichsweise hohen Männchenanteil wechseln mit Populationen mit klarem Weibchenüberschuss ab, wie etwa am Beispiel der Populationen aus Bad Segeberg und Pevestorf deutlich wird, die als vergleichsweise männchenreiche Populationen benachbart zu solchen Populationen liegen, in denen kaum Männchen gefunden wurden. Dabei sprechen alle Ergebnisse gegen einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Männchen und der Jahreszeit und somit gegen ein Artefakt, das durch den Zeitpunkt der Aufsammlung entstanden ist. Dagegen ist die positive Korrelation zwischen Weibchenanteil und prozentualem Anteil der Haplotypen HT1 und HT1* und umgekehrt zwischen Männchenanteil und prozentualem Anteil der Haplotypen HT2 und HT2* eindeutig zu erkennen. Da Haplotyp HT1 entweder allein oder zusammen mit dem abgewandelten Typ HT1* in fast allen Populationen die häufigste Form darstellt, folgt unmittelbar ein deutlicher Weibchenüberschuss.

Es ist folglich unzweifelhaft, dass die Geschlechterverteilung in einer beliebigen Population mit den prozentualen Anteilen der vorkommenden mitochondriellen Haplotypen in Verbindung zu bringen ist, und da ein bestimmter mtDNA-Haplotyp immer mit einem bestimmten *Wolbachia*-Typ assoziiert ist, besteht die Möglichkeit eines ursächlichen Zusammenhang mit dem jeweiligen Infektionstyp. Die geographische Analyse der Haplotypen-Verteilung der Art *A. lythri* schließt die Analyse der *Wolbachia*-Infektionen der gesammelten Individuen nicht mit ein, jedoch zeigen die für die phylogenetische Analyse durchgeführten stichprobenartigen Untersuchungen sowie die gründliche Analyse der Tiere aus der Population in Wedel, die für die Verpaarungsexperimente verwendet wurden, dass die stabile Assoziation zwischen mtDNA und *Wolbachia* für alle Populationen angenommen werden kann. Daher kann man auch hier vermuten, dass die Infektion mit einem bestimmten Stamm mit dem Geschlechterverhältnis korreliert.

4.3.2. Verbreitung der Haplotypen

Die geographische Analyse verdeutlicht nicht nur, dass das Vorkommen mehrerer unterschiedlicher mtDNA-Haplotypen innerhalb von Populationen von allgemeiner Bedeutung ist, sondern auch, dass es zwischen den Populationen Unterschiede bezüglich der prozentualen Anteile der einzelnen Haplotypen gibt und dass im Zusammenhang damit die Verteilung der prozentualen Anteile von Männchen und Weibchen zu sehen ist. Es

findet sich nicht jeder Haplotyp in jeder Population, und ein erhöhter Anteil männlicher Individuen wird durch unterschiedliche Kombinationen und/oder Häufigkeiten mitochondrieller Haplotypen bedingt - entweder in erster Linie durch HT2, durch HT2* oder aber durch HT3, wobei HT2 und HT2* sich aus unbekannten Gründen offenbar weitgehend gegenseitig ausschließen.

Größtenteils scheint die Verteilung der Haplotypen und ihre Häufigkeit über den untersuchten geographischen Bereich zufällig zu sein, doch in einigen Fällen lassen sich auch auffällige Muster erkennen. So kommt HT2 südlich der Population Barendorf (Lüneburg) nicht vor und wird ab dort durch HT2* ersetzt; HT2* fand sich nördlich von Barendorf lediglich in einer der untersuchten Population (Bad Segeberg) und dort parallel zu HT2. Dieses Muster spricht entweder für zwei voneinander unabhängige Besiedelungen des untersuchten Gebiets durch Individuen der gleichen Art, aber mit leicht unterschiedlichen mtDNA-Varianten (die Haplotypen HT2 und HT2* unterscheiden sich auf der Basis der COI/II-Sequenzen kaum) oder aber für einen vollständige Austausch des einen Haplotyps durch den anderen - HT2 durch HT2*, falls der Austausch von Nord nach Süd verläuft, oder HT2* durch HT2, falls er von Süd nach Nord verläuft. In beiden Fällen sollte es jedoch Populationen geben, in denen beide Haplotypen parallel auftreten. Hinweise auf Introgression von mitochondrieller DNA gibt es hier nicht, denn HT2* weist eine große Sequenzähnlichkeit zu HT2 auf.

Der seltenere Haplotyp HT3 findet sich nur im Norden Deutschlands mit einer deutlich höheren Frequenz in Richtung Osten und fehlt südlich der Linie Barendorf - Pevestorf. Betrachtet man das Verbreitungsmuster dieses Haplotyps, so scheint es, als ziehe sich der Verlauf entlang der Elbe, mit abnehmenden Anzahlen vom Fundort Pevestorf in Richtung Elbmündung nach Wedel und Kollmar über Barendorf (etwa 20 Kilometer von der Elbe entfernt). Nach Norden (Fundorte Tümlauer Koog, Altenteil) nimmt die Häufigkeit stark ab, am nördlichsten Fundort (Treia) konnte dieser Haplotyp gar nicht nachgewiesen werden. Dieses Muster lässt die Herkunft dieses Haplotyps im Osten vermuten, während die Ausbreitungsrichtung, soweit aus den vorliegenden Daten ersichtlich, in Richtung Nordwesten verläuft.

HT1 ist der einzige Haplotyp, der in ganz Deutschland nachgewiesen werden konnte (Ausnahme: Ilmenau; hier liegt jedoch eine geringe Stichprobengröße vor, so dass diese Form möglicherweise übersehen wurde). Die auffällige Häufigkeit dieses Haplotyps ist relativ leicht zu erklären: Da HT1 nur bei Weibchen vorkommt, wird er auch mit entsprechend höherer Frequenz weitergegeben als diejenigen Haplotypen, die zur Hälfte in

Männchen vorliegen, also HT2, HT2* und HT3. Da nur Weibchen entstehen, wächst die Populationsgröße von HT1 viel schneller als die der anderen. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Männchen sich mit einem Weibchen des Haplotyps HT2 oder HT3 paart, geringer als eine Verpaarung mit einem Weibchen des Haplotyps HT1.

4.4. Test auf cytoplasmatische Inkompatibilität

4.4.1. Kompatibilität innerhalb von *Altica lythri*

Cytoplasmatische Inkompatibilität ist der am häufigsten durch *Wolbachia* induzierte Phänotyp und tritt sowohl zwischen nicht infizierten Weibchen und infizierten Männchen (unidirektionale Inkompatibilität) als auch zwischen mit unterschiedlichen Stämmen infizierten Individuen auf (bidirektionale Inkompatibilität). Bei *A. lythri* wäre daher theoretisch das Auftreten beider Varianten möglich, da innerhalb dieser Art drei unterschiedliche Stämme vorkommen, andererseits Wirtsindividuen aber auch frei von *Wolbachia* sein können. Cytoplasmatische Inkompatibilität führt mindestens zu einer starken Reduktion der Schlupfraten, wenn nicht sogar zu einem völligen Ausbleiben des Schlupfes. Bei *A. lythri* fanden sich Schlupfraten von 0% in Einzelfällen bei nahezu allen Paarungskombinationen, also bei potenziell kompatiblen genau so wie bei potenziell inkompatiblen Verpaarungen. Diese Fälle werden daher auf erfolglose Kopulationen zurückgeführt und nicht als Beispiele für cytoplasmatische Inkompatibilität angesehen. Unterschiedliche Schlupfraten zwischen den acht unterschiedlichen Verpaarungsansätzen erwiesen sich als nicht signifikant, so dass anhand der gewonnenen Daten davon ausgegangen werden kann, dass in dem hier untersuchten System weder unidirektionale noch bidirektionale cytoplasmatische Inkompatibilität auftritt.

Interesant ist jedoch die bei mit dem Stamm wA1 infizierten Weibchen signifikant erhöhte Eiablagerate bei im Vergleich zu allen anderen Weibchen nicht erhöhter Nachkommenzahl (zur Diskussion dieses Phänomens siehe Abschnitt 4.5.1). Für keine der übrigen Daten zu den Anzahlen abgelegter Eier, geschlüpfter Larven und unterschiedlichen Schlupfraten, egal, ob die Daten jeweils auf den Infektionstyp oder den Infektionsstatus bezogen wurden, konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden, die beispielsweise auf eine Erhöhung der Fekundität infizierter Weibchen hindeuten könnten.

4.4.2. Einflüsse auf die Ausprägung cytoplasmatischer Inkompatibilität

Die Intensität der Ausprägung cytoplasmatischer Inkompatibilität ist zeitlich nicht stabil, sondern nimmt mit fortschreitendem Alterungsprozess des männlichen Wirts ab (Hoffmann

et al. 1986, Hoffmann 1988, Hoffmann et al. 1990, Reynolds & Hoffmann 2002). Die Abnahme hängt mit der Abnahme des Anteils infizierter Spermiencysten zusammen (Bressac & Rousset 1993). Anscheinend reicht die Teilungsrate der Bakterien nicht aus, um mit der Produktionsrate neuer Spermien Schritt zu halten. Die Alterung der Weibchen dagegen scheint keinen erkennbaren Effekt auf die Intensität der Inkompatibilität zu haben. Dass unterschiedliche Intensitätsausprägungen cytoplasmatischer Inkompatibilität zudem auch vom jeweiligen *Wolbachia*-Stamm abhängen, zeigen Sasaki & Ishikawa (2000) - manche Stämme rufen also stärkere Inkompatibilität hervor als andere.

Da sich wischen der Bakteriendichte im Wirt und der Intensität der Ausprägung der Inkompatibilität oftmals eine positive Korrelation findet (Poinsot et al. 1998, Perrot-Minnot & Werren 1999, Noda et al. 2001, Veneti et al. 2003), spricht man auch vom "bacterial density"-Modell der cytoplasmatischen Inkompatibilität (Breeuwer & Werren 1993). Dieses Modell ließ sich mittels quantitativer real-time PCR (RT-q PCR) über die in vivo-Bestimmung der Bakterienzahlen bestätigen (Bordenstein et al. 2006).

Im Zusammenhang mit den genannten Einschränkungen stellt sich die Frage, wie sich die Situation bei Käfern darstellt, die mit beginnender Fortpflanzungsperiode bereits ein gewisses Alter erreicht haben - dies ist eine ganz anderen Situation, als sie sich bei der sehr kurzen Generationszeit etwa bei *Drosophila* darstellt. *Altica*-Imagines schlüpfen etwa ein halbes Jahr, bevor die Reproduktionsphase im Frühling des darauffolgenden Jahres beginnt. Ob es bei *Altica* während des Alterungsprozesses zu einer Abnahme der Bakteriendichte kommt, bliebe zu klären, aber wenn es so wäre, bestünde gar nicht die Möglichkeit, das es zu einer Ausprägung cytoplasmatischer Inkompatibilität in diesem Taxon kommt.

4.5. Andere Einflüsse von *Wolbachia* auf die Reproduktion

Das für die Gattung *Altica* bekannte Phänomen des verschobenen Geschlechterverhältnisses wurde mittels verschiedener Ansätze im Detail für die Art *A. lythri* untersucht. Die Ursache ist die ausschließlich weibliche Nachkommenschaft aller Weibchen sowohl der Haplotypen HT1 als auch HT1*. Dies lässt sich (indirekt) aus den Ergebnissen der geographischen Analyse der Haplotypenverteilung in insgesamt 14 Populationen (indirekter Nachweis: alle Individuen der Haplotypen HT1 und HT1* sind weiblich) und auch (direkt) aus den Ergebnissen der Nachzucht im Labor nachweisen - hier in Kombination mit dem Nachweis der jeweiligen *Wolbachia*-Infektion.

Die klassische Hypothese, nach der die Männchen nach der winterlichen Diapause im Frühling sehr früh ihre Überwinterungsquartiere verlassen, sich paaren und gleich darauf sterben, was dazu führen könnte, dass in einem bestimmten Zeitraum nur wenige männliche Individuen gefunden werden, kann durch die hier durchgeführten Laborzuchten klar widerlegt werden. In den Gruppen, die aus Eiern aufgezogen wurden, fanden sich unter den Imagines ebenso wenige Männchen wie in Freilandpopulationen (für die Population in Wedel: Anteil der Männchen unter den Nachkommen der Tiere der Laborzucht: 4,9% der Gesamtanzahl der Nachkommen; Anteil der Männchen im Freiland: 8,1%). Daher ist es viel wahrscheinlicher, dass der Mangel an Männchen durch eine Infektion mit *Wolbachia* hervorgerufen wird. Darüber, auf welchem Wege dies letztlich geschieht, können derzeit einige Vermutungen angestellt werden (Abschnitt 4.5.1).

Anhand der Ähnlichkeit der *ftsZ*-Sequenzen der bei *Altica* nachgewiesenen *Wolbachia*-Stämme mit den Sequenzen der von anderen Wirten bekannten *Wolbachia*-Stämme wie etwa wForm, wCer1 und wMa kann nicht auf den bei *Altica* hervorgerufenen Phänotyp geschlossen werden, da *Wolbachia*-Stämme in unterschiedlichen Wirten ganz unterschiedliche Auswirkungen haben können (Boyle et al. 1993, Bouchon et al. 1998, Fujii et al. 2001, Sasaki et al. 2002). Die Bakterien weisen bezüglich des hervorgerufenen Phänotyps eine hohe Plastizität auf (Jaenike 2007), daher muss der Einfluss eines bestimmten *Wolbachia*-Stammes für jede Wirtsart immer wieder neu ermittelt werden.

Die im Folgenden dargestellten Schlußfolgerungen und Interpretationen, die sich aus den bei *A. lythri* durchgeführten Analysen zum Geschlechterverhältnis, zur Haplotypenverteilung sowie aus den Ergebnissen der Verpaarungsexperimente ableiten lassen, bieten erste Anhaltspunkte bezüglich der Auswirkungen von *Wolbachia*-Infektionen auf *Altica* und insbesondere auf *A. lythri*. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um zum Einen zu klären, ob *Wolbachia* tatsächlich für das verschobene Geschlechterverhältnis verantwortlich ist und zum Anderen, auf welchem Mechanismus die Einflussnahme beruht - beispielsweise durch eine Eliminierung der Bakterien durch Antibiotika oder Wärme (Kyei-Poku 2003).

4.5.1. Stamm wA1

Die Ergebnisse zur Analyse des Geschlechterverhältnisses der Nachkommen und im Zusammenhang damit die Assoziation des mtDNA-Haplotyps HT1 mit dem *Wolbachia*-Stamm wA1 lassen vermuten, dass dieser Stamm bei *A. lythri*-Weibchen einen Einfluss auf die Reproduktion ausübt und die Produktion von männlichen Nachkommen verhindert.

Als wahrscheinlichster Phänotyp kann Male Killing angenommen werden. Aus welchen Gründen Feminisierung und die Induktion von Parthenogenese als unwahrscheinlich angesehen werden, soll hier zunächst kurz diskutiert werden.

Feminisierung

Die Folge einer Infektion ist die Umwandlung von (genetisch) männlichen Individuen in funktionelle Weibchen; die Schlupfrate wird folglich nicht beeinflusst. Sie tritt verbreitet innerhalb der terrestrischen Isopoda (Juchault et al. 1994, Bouchon et al. 1998) auf. Bei Insekten wurde dieser Phänotyp bisher lediglich bei *Eurema hecabe* (Lepidoptera; Hiroki et al. 2002), bei der Weibchen das heterogametische Geschlecht repräsentieren (WZ/ZZ-Geschlechtsbestimmung), und bei *Zyginidia pullula* (Hemiptera) mit einem XX/XO-System der Geschlechtsbestimmung, bei der die Weibchen durch XX repräsentiert werden, nachgewiesen (Negri et al. 2006). Eine Untersuchung der Chromosomen bei *Zyginidia* ergab, dass solche Weibchen, die einen zwittrigen Phänotyp zeigten, das heißt, sekundäre Geschlechtsmerkmale aufwiesen, die typisch für Männchen sind, einen männlichen Genotyp hatten; es handelte sich um feminisierte Männchen (Negri et al. 2006). Folglich könnte ein Einfluss von feminisierenden Bakterien bei *Altica* durch eine Untersuchung der Chromosomensätze aufgedeckt werden, sofern es möglich ist, die Geschlechtschromosomen zu identifizieren (was mit den hier angefertigten einfachen Chromosomenpräparaten nicht möglich war). Zunächst kann für *A. lythri* und für alle anderen zur Verfügung stehenden Arten lediglich festgestellt werden, dass keines der präparierten Tiere in irgendeiner Form Hinweise auf Feminisierung erkennen lässt.

Parthenogenese

Von *Wolbachia* induzierte thelytoke Parthenogenese scheint, bisherigen Ergebnissen zu Folge, auf haplodiploide Systeme beziehungsweise arrhenotoke Fortpflanzung beschränkt zu sein (Stouthamer 1997, Stouthamer et al. 1999), und wurde bisher in erster Linie innerhalb der Ordnung Hymenoptera, aber auch bei Fransenflüglern (Thysanoptera) und bei Milben (Acari) nachgewiesen (Stouthamer et al. 1990, Arakaki et al. 2001, Weeks & Breeuwer 2001). Jedoch gibt es zumindest Hinweise darauf, dass diese Einschränkung nicht notwendigerweise die Regel ist, denn in einigen Fällen konnte gezeigt werden, dass die Bakterien im Prinzip für Fälle von apomiktischer Parthenogenese verantwortlich sein könnten, welche bei diplodiploiden Arthropoden vorkommt (Weeks & Breeuwer 2001).

Auch wenn es in der Ordnung Coleoptera zahlreiche Beispiele für Arten mit parthenogenetischer Fortpflanzung gibt und auch mindestens zwei parthenogenetische Arten der Unterfamilie Alticinae bekannt sind (Furth 1994; Abschnitt 4.6.1), ist über einen Zusammenhang zwischen Parthenogenese und *Wolbachia*-Infektion bei Käfern nichts bekannt. Letztlich gibt es auch aus den Laborzuchten für *A. lythri* keinen Hinweis auf parthenogenetische Fortpflanzung, da sich Eier von unverpaarten Weibchen in keinem Fall als entwicklungsfähig herausstellten. Auch die große Anzahl aus dem Feld stammender Weibchen, deren Eier sich im Labor nicht entwickelten, spricht gegen Parthenogenese. Hier spielte weder der mtDNA-Haplotyp noch der *Wolbachia*-Stamm eine Rolle. Es bedarf also in jedem Fall der Kopulation und der Übertragung von Spermien, um die Entwicklung der Eier zu ermöglichen. Reproduktion mittels Gynogenese wäre allerdings eine Möglichkeit, die hier in Betracht gezogen werden muss. Hierzu wäre die Untersuchung der aus den Verpaarungsexperimenten hervorgegangenen Larven ein Weg, diese Frage zu klären: Mittels Mikrosatellitenanalysen könnte festgestellt werden, ob die Kopulationspartner der verpaarten Weibchen tatsächlich auch die genetischen Väter der aus der jeweiligen Verpaarung hervorgegangenen Nachkommen waren, oder ob lediglich die Spermien zur Aktvierung der Eientwicklung benötigt werden, dass also der väterliche Chromosomensatz bei den Nachkommen gar nicht vorhanden ist.

Male Killing

Das Vorkommen und die Wirkung von *Wolbachia*, die in der Lage sind, selektiv das Absterben der männlichen Nachkommen zu verursachen, ist im Gegensatz zu den Phänotypen "Feminisierung" und "Parthenogenese" nicht auf ein bestimmtes System der Geschlechtsbestimmung beschränkt. Die Bakterien verursachen Male-Killing bei Insektenarten mit heterogametischen Männchen ebenso wie bei Insektenarten mit homogametischen Männchen, und sie wurden auch bei haplodiploiden Arten gefunden.

Die anhand der Verpaarungsexperimente ermittelten Schlupfraten bei mit wA1 infizierten *A. lythri*-Weibchen sprechen auf den ersten Blick gegen Male-Killing, denn die Schlupfraten unterscheiden sich nicht signifikant zwischen infizierten und nicht infizierten Weibchen. Wäre wA1 ein Male-Killer, müsste die Schlupfrate bei entsprechend infizierten Weibchen um etwa 50% reduziert sein. Allerdings könnte das auffällige Phänomen, dass Weibchen, die mit diesem Stamm infiziert sind, offenbar mehr Eier produzieren müssen, um eine annähernd gleich hohe Schlupfrate zu erzielen wie mit wA2 beziehungsweise nicht infizierte Weibchen, ein Hinweis auf eine Anpassung an einen Einfluss der Bakterien sein.

Vielleicht gleichen die Weibchen eine durch Male Killing bedingte Reduktion der Nachkommenzahl durch eine erhöhte Eiablagerate aus.

Die in der Laborzucht zum Geschlechterverhältnis und zum Infektionstyp erhobenen Daten geben weiterhin Anlass zur Diskussion, denn 13 der 24 Weibchen des Haplotyps HT1, bei denen keine Infektion mit *Wolbachia* nachgewiesen werden konnte, brachten ebenfalls ausschließlich weibliche Nachkommen hervor. Als Erklärung hierfür kommen mehrere Möglichkeiten in Frage. Zum Einen könnte es sein, dass *Wolbachia* nicht die Ursache für die abnormale Reproduktion ist. Diese radikale Abkehr von der wahrscheinlichsten und besten Erklärung für das verschobene Geschlechterverhältnis bei Individuen des Haplotyps HT1 ist jedoch nicht unbedingt notwendig. Die einfachste Erklärung ist, dass die Infektion übersehen wurde, möglicherweise, weil sich die zum Nachweis verwendeten Primer aus nicht näher bestimmbaren Gründen nicht anlagern konnten. Hier wären Analysen unter Verwendung alternativer Primer und/oder anderer Genomabschnitte geeignet, die Ergebnisse zu bestätigen oder zu widerlegen. Lässt sich zudem nachweisen, dass das einzige Weibchen des Haplotyps HT1, das in der Lage war, männliche Nachkommen hervorzubringen, tatsächlich nicht infiziert war, ließe sich dies wiederum mit einem Einfluss des Stammes wA1 auf die Reproduktion begründen.
In diesem Zusammenhang ist jedoch zu erwähnen, dass alle sieben Weibchen des Haplotyps HT1* ebenfalls ausschließlich weibliche Nachkommen produzierten. Da alle Ergebnisse dafür sprechen, dass Tiere dieses Haplotyps grundsätzlich *keine* Infektion aufweisen, kann hier auch kein Zusammenhang mit *Wolbachia* hergestellt werden.[2]

B Hinweise von anderen Arten

Bezüglich des Stammes wA1 liegen von anderen Arten unterschiedliche Hinweise vor. Bei *A. carinata*, *A. helianthemi* und *A. palustris* waren Männchen und Weibchen gleichsam mit *Wolbachia* des Stammes wA1 infiziert; ein (deutlich) verschobenes Geschlechterverhältnis lag in dieser Untersuchung bei *A. palustris* vor. Für die anderen mit wA1 infizierten Arten ist eine Beurteilung aufgrund der geringen Stichprobe nicht möglich, doch ist anzumerken, dass alle drei zur Verfügung stehenden Individuen der Art *A. helianthemi* männlich waren. Bei *A. oleracea*, die ebenfalls Infektionen mit wA1 aufweist, ist ebenfalls eine ausgeprägte Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zu beobachten; das in der phylogenetischen

[2] Allerdings fand sich bei den Untersuchungen zum Auftreten cytoplasmatischer Inkompatibilität bei einem Weibchen des Haplotyps HT1* eine Infektion mit *Wolbachia*. Der Stamm konnte aufgrund des schwachen PCR-Produkts nicht determiniert werden.

Analyse enthaltene männliche Individuum wies keine Infektion auf, und die Infektionsraten schienen ebenfalls niedrig zu sein. Diese Ergebnisse deuten unterschiedliche Auswirkungen des Stammes wA1 auf den Wirt an - eventuell eine Bestätigung der bekannten Tatsache, dass der von *Wolbachia* ausgeprägte Phänotyp von genetischen Hintergrund des Wirtes abhängt. Andererseits bietet keines der Ergebnisse einen klaren Gegenbeweis, dass eine Beeinflussung der Reproduktion mittels Male Killing im *Altica*-*Wolbachia*-System *nicht* involviert ist.

4.5.2. Stamm wA2

Wie die Nachzucht der Art *A. lythri* im Labor zeigt, ist die Nachkommenschaft von Weibchen mit einer Infektion mit dem Stamm wA2 zu etwa 50% männlichen Geschlechts. Dieser direkte Nachweis konnte lediglich für Individuen des Haplotyps HT2 erfolgen, da HT2* in der analysierten Population aus Wedel allen Untersuchungen zufolge nicht vorkommt; aufgrund der geographischen Analyse der Haplotypenverteilung und der ermittelten Daten zu Geschlechterverhältnissen und Häufigkeiten der Haplotypen kann jedoch geschlossen werden, dass für Individuen des Haplotyps HT2*, die mit wA2 infiziert sind, dasselbe gilt, da Männchen und Weibchen der Haplotypen HT2 und HT2* jeweils im gleichen Häufigkeitsverhältnis zueinander stehen (Abb. 31 in Abschnitt 3.2.3).

Ein Einfluss dieses Stammes auf das Geschlechterverhältnis kann folglich ausgeschlossen werden. Da sich andererseits cytoplasmatische Inkompatibilität nicht nachweisen ließ, gibt es keinen Hinweis darauf, dass der Stamm wA2 einen der vier bekannten Phänotypen hervorruft. Im Falle eines neutralen Verhaltens ohne Selektionsvorteil für einen infizierten Wirt hätte eine Infektion nur in Folge genetischer Drift dauerhaften Bestand in einer Population (Shoemaker et al. 2003, Jansen et al. 2008). Anders verhielte es sich bei einem positiven Einfluss auf die Fitness des Wirts, welcher sich beispielsweise in der Steigerung der Fekundität ausdrücken könnte. Dies konnte jedoch bei *A. lythri* nicht nachgewiesen werden.

B Hinweise von anderen Arten

Der *Wolbachia*-Stamm wA2 lässt auch bei Einbeziehung anderer Wirtsarten gewisse Tendenzen erkennen. Bei den Arten *A. aenescens* und *A. ericeti* gibt es nach den hier erhobenen Daten keine Hinweise auf ein verschobenes Geschlechterverhältnis (die Daten für *A. aenescens*, *A. ericeti* und *A.* sp. 1 stammen allein aus Aufsammlungen im Feld). Für *A. brevicollis* ist die Datenlage unklar, da im Datensatz lediglich ein Individuum enthalten

ist. Die insgesamt zwölf Individuen der unbestimmten Art *A.* sp. 1, von denen vier in der phylogenetischen Analyse enthalten sind, sind alle weiblich. Abgesehen hiervon scheint sich zu bestätigen, dass eine Infektion mit wA2 sich nicht auf das Geschlechterverhältnis auswirkt.

4.5.3. Stamm wB

Die zu dem nur bei *A. engstroemi*, *A. quercetorum* und *A. lythri* nachgewiesenen *Wolbachia*-Stamm wB gesammelten Daten lassen nur wenige und zum Teil widersprüchliche Rückschlüsse zu. Im Vergleich zu wA1 und wA2 relativ selten, sowohl im Hinblick auf die infizierten Arten als auch auf die infizierten Individuen innerhalb der Art *A. lythri*, wurde wB zumindest bei *A. lythri* sowohl bei Weibchen als auch bei Männchen nachgewiesen. Daraus ist zu folgern, dass infizierte Weibchen männliche Nachkommen hervorbringen, und wenn man von einer konstanten Assoziation zwischen dem Haplotyp HT3 und wB ausgeht, zeigt auch die geographische Analyse sehr deutlich, dass von einem ausgeglichenen Geschlechterverhältnis ausgegangen werden kann (Abb. 31 in Abschnitt 3.2.3).

4.6. Der Einfluss anderer Bakterien

Auch wenn die für *Altica* erhobenen Daten deutlich für *Wolbachia*-Infektionen als Ursache für die Beeinflussung der Reproduktion sprechen, soll nicht darüber hinweggesehen werden, dass Male-Killing, Feminisierung sowie die Induktion von Parthenogenese auch von anderen Bakterien hervorgerufen werden können.

So kann Male-Killing auch von anderen Bakteriengruppen, *Arsenophonus*, *Spiroplasma*, *Rickettsia* sowie von Flavobakterien, verursacht werden (Hurst et al. 1999c, Hurst et al. 2003). Flavobakterien sind für Male Killing bei Marienkäfern verantwortlich (Hurst et al. 1997, 1999a), und für *Spiroplasma* wurde bei *Drosophila* (Williamson & Poulson 1979, Montenegro et al. 2005, Kageyama et al. 2006, Mateos et al. 2006, Pool et al. 2006), Marienkäfer (Hurst et al. 1999b, Majerus et al. 1999, Tinsley & Majerus 2006) sowie einen Schmetterling (Jiggins et al. 2000b) der entsprechende Nachweis erbracht. Rickettsien wiederum rufen bei Marienkäfern der Gattung *Adalia* (Werren et al. 1994, Schulenburg et al. 2001) und bei einer Prachtkäferart (Lawson et al. 2001) Male-Killing hervor. Bakterien dieser Gattung verursachen außerdem thelytoke Parthenogenese bei *Neochrysocharis* (Hymenoptera; Hagimori et al. 2006).

Auch Feminisierung kann durch Bakterien anderer Gruppierungen hervorgerufen werden, so durch ein endosymbiontisches Bakterium, das nicht mit *Wolbachia* verwandt ist, bei der Milbe *Brevipalpus phoenicis* (Weeks et al. 2001). Außerdem kann auch eine Reihe von Protisten eine Feminisierung ihrer Wirte bewirken (Rigaud 1997).

Cardinium, ein weiteres Proteobakterium, das nicht näher mit *Wolbachia* verwandt ist, ruft Feminisierung und daher thelytok-parthenogenetische Fortpflanzung bei der parasitoiden Wespe *Encarsia hispida* (Giorgini et al. 2009) hervor sowie Parthenogenese in ebendieser Parasitoiden-Gattung (Zchori-Fein et al. 2001).

Alle Auswirkungen, die *Wolbachia* auf den Wirt haben kann, können folglich ebenso gut von anderen Organismen hervorgerufen werden. Analysen zu den Auswirkungen einer *Wolbachia*-Infektion schließen allerdings meist eine Behandlung der Wirte mit Antibiotika oder eine Wärmebehandlung ein, welches nicht nur die Wolbachien, sondern auch andere Bakterien eliminiert, die reproduktionsspezifische Charakteristika bedingen könnten; auf der anderen Seite ist die Verwendung *Wolbachia*-spezifischer Primer sehr selektiv, und Infektionen mit anderen Taxa können übersehen werden (Weeks et al. 2003). Daher erscheint ein Einsatz spezifischer Primer zur Detektion weiterer Bakterien wichtig, um sicherzustellen, dass es keine anderen Elemente gibt, die für die Induktion bestimmter Phänomene verantwortlich sein könnten.

4.7. Alternativen zur Erklärung des Geschlechterverhältnisses

Zwar sind die reproduktiven Besonderheiten bei *A. lythri* deutlich mit dem Vorkommen bestimmter *Wolbachia*-Stämme assoziiert, doch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Assoziation ebenso mit bestimmten mtDNA-Haplotypen besteht. Unausgeglichene Geschlechterverhältnisse, mit anderen Worten „non-Mendelian segregation“, auch „segregation distortion“ oder „meiotic drive“ genannt, können, abgesehen von Infektionen mit unterschiedlichen Arten von Mikroorganismen (Abschnitt 4.6.3), mehrere alternative Ursachen haben.

Unisexuelle Taxa sind meist durch Hybridisierung entstanden (Vrijenhoek et al. 1989, Bullini & Nascetti 1990). Diese reproduzieren zumeist entweder mittels Parthenogenese oder Gynogenese; mitunter kommt auch Hybridogenese vor. Es besteht auch die Möglichkeit einer Koexistenz bisexueller und unisexueller Linien innerhalb einer Art. Bei *Calligrapha* (Chrysomelidae) konnte eine Assoziation zwischen Unisexualität und Polyploidie nachgewiesen werden; hier finden sich sowohl diploid-bisexuelle als auch tetraploid-unisexuelle Individuen (Robertson 1966, Gómez-Zurita et al. 2004).

Unisexualität im Zusammenhang mit Polyploidie, verursacht durch Hybridisierung, findet sich im Tierreich auch bei anderen Taxa. Man nimmt an, dass diese polyploiden Hybride durch Rückkreuzung mit einer der Elternarten entstanden sind (Suomalainen et al. 1987, Saura et al. 1993, Simon et al. 2003); jedoch kann durch Hybridisierung zwischen zwei Arten auch eine dritte, neue Art entstehen, ohne dass es zu einer Änderung der Chromosomenzahl kommt (homoploide Artbildung durch Hybridisierung: Dowling & Secor 1997, Gross & Rieseberg 2005, Maváres & Linares 2008).

Polyploidie und Parthenogenese konnten bei *A. lythri* nicht nachgewiesen werden, doch die bereits erwähnte Möglichkeit einer Reproduktion mittels Gynogenese bedarf der Überprüfung.

Nachkommen aus interspezifischen Paarungen, wenn sie überhaupt entstehen und lebensfähig sind, weisen mitunter ein gestörtes Geschlechterverhältnis auf. Dabei fehlt gewöhnlich das heterogametische Geschlecht, tritt in reduzierter Anzahl auf oder ist steril. Dieses Phänomen bezeichnet man als „Haldane's Rule" (Haldane 1922, Orr 1997); es wurde bei vielen ganz unterschiedlichen Taxa nachgewiesen (Tao et al. 2001, Naisbit et al. 2002, Orr & Irving 2005). Für die Interpretation der bei *A. lythri* gefundenen Verhältnisse werfen die Voraussetzungen für Haldane's Rule allerdings Schwierigkeiten auf, denn die Gruppe der Individuen des Haplotyps HT1 (und HT1*) müssten als eigene Art abgegrenzt werden, was nicht nur aufgrund der in Abschnitt 4.1.2.1 angeführten Argumente unwahrscheinlich ist; es bliebe weiterhin die Frage nach dem Grund für das Fehlen von Männchen in dieser Gruppe. Wenn man hierfür beispielsweise Gynogenese als Ursache annimmt, benötigt man Haldane's Rule für die Erklärung der ausschließlich weiblichen Nachkommenschaft nicht mehr. Andererseits bietet die Kombination dieser Möglichkeiten einen weiteren Erklärungsansatz. Wenn man annimmt, dass HT1 über Introgression in die Art *A. lythri* gelangt ist, könnte man weiterhin mutmaßen, dass die aus der Hybridisierung hervorgegangenen Nachkommen als Folge von Haldane's Rule alle weiblichen Geschlechts waren. Diese Hybride könnten in der Folge mit der Elternart *A. lythri* (Haplotyp HT2 oder HT3) über Gynogenese fortpflanzungsfähig sein. Diese Nachkommen wären wiederum immer weiblich und würden den Haplotyp HT1 aufweisen.

4.8. Mögliche Folgen des verschobenen Geschlechterverhältnisses für *Altica lythri*

An Erklärungen für das bei *Altica* oft zu beobachtende verschobene Geschlechterverhältnis mangelte es bisher, und Spekulationen über die Ursache - etwa Parthenogenese - wurden

offenbar bisher nicht überprüft. Mit dieser Arbeit kann nun erstmalig für *A. lythri* gezeigt werden, dass die Häufigkeit weiblicher Individuen mit dem prozentualen Anteil von Tieren mit dem mtDNA-Haplotyp HT1/HT1* beziehungsweise mit einer Infektion mit einem bestimmten *Wolbachia*-Stamm korreliert. Ungeklärt ist aber die Frage, ob und wenn ja, *wie* die Populationen mit einem teilweise extremen Mangel an Männchen überlebensfähig sind. In diesem Zusammenhang soll im Folgenden noch einmal auf die im Zuge der Labornachzucht mit Weibchen aus der Population in Wedel Bezug genommen werden.

Die Gesamtzahl der Nachkommen, die von jedem der aus dem Freiland stammenden 109 Weibchen erhalten wurde, ist von Weibchen zu Weibchen deutlich unterschiedlich und bewegt sich zwischen 0 und 130 Imagines pro Muttertier. Das Verhältnis zwischen der Anzahl weiblicher und männlicher Nachkommen (ermittelt anhand der Imagines) ähnelt dem im Freiland ermittelten Geschlechterverhältnis (4,9% Männchen in der Laborzucht, 8,1% Männchen im Freiland). Alle Fälle von fehlendem Nachwuchs - 36 Weibchen brachten keine Nachkommen hervor - sind darauf zurückzuführen, dass aus den abgelegten Eiern keine Larven schlüpften, und können daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf fehlende Befruchtung und somit auf unverpaarte Weibchen zurückgeführt werden. Auffällig ist die Zunahme des Anteils reproduktionsfähiger Weibchen im Verlaufe des Frühlings beziehungsweise bei längerer gemeinsamer Hälterung zusammen mit einigen wenigen Männchen. Es ist gut vorstellbar, dass ein hoher Anteil Weibchen im Freiland für eine gewisse Zeit unbefruchtet bleibt, dass jedoch im Laufe des Frühlings der Anteil befruchteter Weibchen zunimmt; dies ist genau das Muster, welches im Labor gefunden wurde. Die im Experiment verwendeten Weibchen wurden über einen Zeitraum von etwa sieben Wochen von Mitte April bis Anfang Juni gesammelt. Die Anzahl der Tage, über die die Weibchen im Labor Zeit hatten, Eier abzulegen, reichte von 11 bis zu 26 Tagen, allerdings hatten die längeren Zeiträume keinen Einfluss auf die Schlupfraten (berechnet anhand des Anteils Weibchen, die entwicklungsfähige Eier legten), folglich ist das Ergebnis kein Effekt, der sich aus der Stichprobengröße ergibt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Männchen in der Lage sind, eine große Anzahl von Weibchen zu befruchten.

Manche Untersuchungen an anderen Arthropoden-Taxa deuten darauf hin, dass unverpaarte Weibchen sich mit signifikant höherer Bereitwilligkeit paaren als bereits verpaarte Weibchen (Sullivan & Jaenike 2006). Zudem konnte in einigen Fällen gezeigt werden, dass sich Weibchen infolge eines Mangels an Männchen mit höherer Wahrscheinlichkeit mit Männchen einer anderen Art paaren. Tatsächlich wurde, wenn auch

nicht regelhaft, nachgewiesen, dass mit *Wolbachia* infizierte Weibchen nicht nur häufiger kopulieren, sondern auch mit höherer Wahrscheinlichkeit Hybrid-Paarungen eingehen als nicht infizierte Weibchen Gazla & Carracedo 2009. Folglich kann der Infektionsstatus der Weibchen einen bedeutenden Einfluss auf mögliche Hybridisierungsereignisse haben, und wenn *Wolbachia* die Wahrscheinlichkeit für Hybridisierung erhöht, können die Bakterien letztlich auch die Introgression von mtDNA fördern. Wenn also in einer Population der Art *A. lythri* ein stark ausgeprägter Mangel an männlichen Paarungspartnern herrscht, könnte dies zur Folge haben, dass vermehrt Paarungen zwischen Weibchen von *A. lythri* und einer anderen Art zustande kommen. Individuen mit dem Haplotyp HT1/HT1* könnten, wie oben angedeutet, ursprünglich durch interspezifische Hybridisierung entstanden sein. Mittels Gynogenese besteht die Möglichkeit, dass diese Gruppe weiterhin bestehen bliebt.

Diese Annahmen können sogar noch weiter ausgeführt werden. Wenn Männchen sehr selten sind und dies durch eine Steigerung der Paarungsfrequenz nicht ausgeglichen werden kann, ist die Anzahl unverpaarter Weibchen mindestens für einen gewissen Zeitraum hoch. Geht man beispielsweise für die Population in Wedel von einem Mittelwert von 6,5% Männchen aus, kommen auf ein Männchen etwa 15 Weibchen - hier ist mit Sicherheit davon auszugehen, dass der Anteil unbefruchteter Weibchen zumindest für einen gewissen Zeitraum hoch ist. Bei dem mit Male-Killing *Wolbachia* infizierten Schmetterling *Acraea encedon* hat dies eine Änderung des Paarungssystems zur Folge, indem Weibchen Balzschwärme bilden, offensichtlich, um Männchen anzulocken (Jiggins et al. 2000c, Jiggins et al. 2002). Dies bedeutet, dass Verhaltensweisen von Männchen, die im Zusammenhang mit Weibchenwahl und Konkurrenz stehen, als Folge einer *Wolbachia*-Infektion nun von den Weibchen gezeigt werden. Unter diesem Gesichtspunkt gewinnt das in Populationen der Art *A. lythri* im Frühling, das heißt zur Paarungszeit, häufig beobachtete Aggregationsverhalten eine ganz neue mögliche Bedeutung, denn es könnte durch die extreme Seltenheit männlicher Individuen hervorgerufen werden; und Weibchen könnten theoretisch durch dieses auffällige Verhalten Männchen aus weiter entfernten Populationen anlocken.

Es ist seit langem bekannt, dass adulte *Altica*-Individuen oft in kleinen Gruppen aggregiert auftreten. So berichtet Phillips (1977) von Gruppen der Art *A. lythri*, die aus 6-12 und manchmal bis zu 40 Individuen bestehen, während aus *A. oleracea* bestehende Gruppen kleiner sind. Auch bezüglich der Art *A. carduorum* wird von einer Tendenz zur Bildung von Aggregationen berichtet (Baker et al. 1972). Untersuchungen ergaben, dass das Aggregationsverhalten dieser Käfer auf ihrer Nahrungspflanze *Cirsium arvense* offenbar

durch Fraßschäden an den Pflanzen, hervorgerufen von artgleichen Individuen, sowie durch den von den Larven abgelegten Kot angeregt wird (Wan & Harris 1996).

Bezüglich der Art *A. lythri* ist hier auf der Grundlage eigener Beobachtungen noch anzumerken, dass diese Ansammlungen ausschließlich im Frühling zu beobachten waren und nicht unbedingt an die Futterpflanze gebunden waren, sondern beispielsweise auch auf abgestorbenen Pflanzenteilen, bevorzugt offenbar auf besonntem, trockenen Schilf oder Rohrkolben oder aber auf trockenem Herbstlaub vom Vorjahr auftraten (Abb. 39). Eberhard et al. (1993) vermuten hinter dem auffälligen Aggregationsverhalten eine Verhaltensweise, die dazu dient, Männchen und Weibchen zusammenzubringen. Diese Interpretation wird auch von Baker et al. (1972) und Phillips (1977) vorgeschlagen.

Abb. 39 Eine Gruppe von *A. lythri*, aufgenommen am Anfang April 2010 am Elbe-Lübeck-Kanal bei Büchen, Schleswig-Holstein. Gut zu erkennen ist die Konzentration des Fraßes auf die junge *Epilobium hirsutum*-Pflanze im Vordergund, während die Pflanzen dahinter nahezu unberührt sind. Ebenfalls deutlich wird hier das typische Verhalten der Käfer, zu dieser Jahreszeit vorzugsweise bei sonnigem Wetter in Gruppen exponiert auf trockenem Laub und Pflanzenteilen aus dem Vorjahr zu sitzen.

Ob das bei *A. lythri* beobachtete Aggregationsverhalten mit der Seltenheit männlicher Individuen korreliert oder grundsätzlich typisch für die Art oder die Gattung ist, muss vorerst offen bleiben, ist aber sicher ein interessanter Ansatz für weiterführende Untersuchungen. Bekannt ist lediglich von einigen wenigen Arten, dass die Überwinterung

in größeren Ansammlungen aus Individuen stattfindet ("Winterlager"; Renken 1956). Wenn die Tiere dann im Frühling gleichzeitig an die Oberfläche kommen, wäre es auch möglich, dass sie kleinräumig in Gruppen zusammenbleiben. Das Aggregationsverhalten einer Nordamerikanischen *Altica*-Art, *A. tombacina*, wurde diesbezüglich genauer untersucht (Morris et al. 1992). Diese Art bildet beständige räumliche Aggregationen auf ihrer Nahrungspflanze *Epilobium angustifolium*. Diese Aggregationen resultieren offenbar aus dem Eiablageverhalten, denn die Eier werden, wie offenbar für *Altica* typisch, in Gelegen abgelegt, sowie aus der Tendenz der Imagines, auf solchen Pflanzen zu verbleiben, auf denen sich bereits weitere Individuen ihrer Art befinden. Die Autoren führen weiterhin an, dass die Käfer am Apex der Pflanzen konzentriert auftreten, wo auch die Paarung stattfindet. Dieses Verhalten wurde auch bei großen Populationen von *A. lythri* im Frühling beobachtet (eigene Beobachtung). Für *A. tombacina* kommen Morris et al. (1992) zu dem Schluss, dass die Bildung von Aggregationen adulter Käfer aus dem Verhalten zur Partnerfindung resultiert.

5. Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Einfluss von *Wolbachia*-Endosymbionten auf Populationsstruktur, prägame Isolation und Speziationsmechanismen bei *Altica lythri* AUBÉ, 1843 (Coleoptera, Chrysomelidae)

Wiederholte Introgression von mtDNA als Folge interspezifischer Hybridisierung ist als wahrscheinlichste Ursache für die Polyphylie der Art *A. lythri* anzunehmen. Diese Hypothese wird von allen bislang gesammelten Daten unterstützt, jedoch kann die Herkunft der mitochondriellen Haplotypen bislang nicht eindeutig geklärt werden. Widersprüchliche Ergebnisse der phylogenetischen Analysen der mitochondriellen beziehungsweise nukleären DNA-Sequenzen deuten jedoch darauf hin, dass auch bei anderen *Altica*-Arten Mitochondrien die Artgrenzen überquert haben. Andererseits ist nach wie vor ungeklärt, wie sich die tatsächlichen phylogenetischen Beziehungen der Arten der Gattung *Altica* darstellen. Eine Überprüfung der Phylogenie unter Verwendung unabhängiger, schnell evolvierender Marker wie etwa Mikrosatelliten, die den Einfluss von *Wolbachia* auf die Populationsstruktur und Muster von Introgression umgehen, sollte die Unklarheiten in diesem System letztlich auflösen.

Die Analyse der *Wolbachia*-Infektionstypen unterstützt die Hypothese über Hybridisierung insofern, als dass konsequente Assoziationen zwischen *Wolbachia*-Stamm und mtDNA-Haplotyp bei *A. lythri* eindeutig und ohne Ausnahme bestätigt werden können. Die Daten deuten auf "genetic hitchhiking" und mehrere "selective sweeps" hin, die durch die Assoziation jedes mtDNA-Haplotyps mit einem spezifischen *Wolbachia*-Stamm bedingt sind.

Hiermit im Zusammenhang ist sicher auch die geographische Häufigkeitsverteilung der Haplotypen zu sehen. Umfangreiche Ausbreitungswellen von *Wolbachia*-Infektionen sind wahrscheinlich der Grund für das gefundene Muster, und nachfolgende Untersuchungen müssten zeigen, wie sich die Häufigkeiten der Haplotypen in den Populationen entwickeln und somit Hinweise über die Ausbreitungseffizienz der assoziierten *Wolbachia*-Stämme geben. Der hohe Prozentsatz infizierter Individuen innerhalb der Art *A. lythri* gibt hierzu erste Anhaltspunkte; jedoch weisen die unterschiedlichen Infektionsfrequenzen der einzelnen Stämme darauf hin, dass die Transmissionseffizienz möglicherweise unterschiedlich ist. WA1 ist daher nicht nur nach der Infektionsfrequenz und der weiten Verbreitung und der Häufigkeit des assoziierten Haplotyps HT1 offenbar der erfolgreichste und am weitesten verbreitete Stamm; möglicherweise erreicht er diese umfassende Verbreitung durch eine effektive Manipulation der Reproduktion des Wirts bis hin zu

einem völligen Fehlen männlicher Individuen. Dabei fehlt bislang ein eindeutiger Nachweis für die tatsächliche Ursache für das Fehlen männlicher Individuen in dieser Gruppe. Auch wenn eine Infektion mit *Wolbachia* eine naheliegende Erklärung bietet, konterkarieren andere Ergebnisse diese Vermutung: Nicht infizierte Weibchen mit den Haplotypen HT1 sowie HT1* bringen im Normalfall ebenfalls ausschließlich weibliche Nachkommen hervor. Folglich können andere Erklärungsmöglichkeiten nicht außer Acht gelassen werden. Da in der Phylogenie der Gattung *Altica* offensichtlich Hybridisierung eine Rolle gespielt hat, könnte die Ursache für das Fehlen des männlichen Geschlechts auch in diesem Zusammenhang stehen, etwa als Folge von Haldane's Rule oder der Bildung von Hybridarten. Da bei *Altica* keine Hinweise auf Polyploidie gefunden wurden und Eier von nicht verpaarten Weibchen nicht zum Schlupf kamen, kann Parthenogenese ausgeschlossen werden. Da Männchen zur Reproduktion notwendig sind, steht Gynogenese jedoch als weitere Möglichkeit, die Eier zur Entwicklung zu bringen, zur Untersuchung.

Es fanden sich keine Hinweise, die auf uni- oder bidirektionale cytoplasmatische Inkompatibilität zwischen den unterschiedlichen Infektionstypen schließen lassen könnten. Einzig die bei mit dem Stamm wA1 infizierten Weibchen erhöhte Eiablagerate deutet auf eine Form der Interaktion hin, bietet jedoch letztlich keinen Nachweis, ob dies tatsächlich auch eine Angleichung der Schlupfrate (im Vergleich mit allen anderen Weibchen) bewirkt.

Mit den zahlreichen, noch offen gebliebenen Fragen und neuen Ansatzmöglichkeiten bieten die bisherigen Ergebnisse eine Grundlage für eine Reihe weitergehender Untersuchungen zum *Altica*-*Wolbachia*-System.

Literatur

Alvarez I & Wendel JR (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Mol Phylogenet Evol 29: 417–434.

Andolfatto P, Scriber JM & Charlesworth B (2003). No association between mitochondrial DNA haplotypes and a female-limited mimicry phenotype in *Papilio glaucus*. Evolution 57:305–316.

Arakaki N, Miyoshi T & Noda H (2001). *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). Proc R Soc Lond B 268:1011-1016.

Bachtrog D, Thornton K, Clark A & Andolfatto P (2006). Extensive introgression of mitochondrial DNA relative to nuclear genes in the *Drosophila yakuba* species group. Evolution 60:292–302

Balcells E (1953). Estudio biológico de *Haltica lythri* subespecie *ampelophaga*, GUERIN-MENEVILLE (Col. Halticinae). P Inst Biol Apl XIV:5-37.

Balcells E (1954a). Estudio biológico de *Haltica lythri* subespecie *ampelophaga*, GUERIN-MENEVILLE (Col. Halticinae). P Inst Biol Apl XVII:5-54.

Balcells E (1954b). Sobre la distribución geográfica de *Haltica lythri* subspecie *ampelophaga*, GUERIN-MENEVILLE. P Inst Biol Apl XVIII:5-41.

Baldo L & Werren JH (2007). Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on *wsp*: spurious lineages and discordance with MLST. Curr Microbiol 55:81–87.

Baldo L, Ayoub NA, Hayashi CY, Russel JA, Stahlhut JK, Werren JH (2008). Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. Mol Ecol 17:557–569.

Baldo L, Bartos JD, Werren JH, Bazzocchi C, Casiraghi M & Panelli S (2002). Different rates of nucleotide substitutions in *Wolbachia* endosymbionts of arthropods and nematodes: arms race or host shifts? Parassitologia 44:179-87.

Baldo L, Bordenstein SR, Wernegreen JJ, Werren JH (2006a). Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. Mol Biol Evol 23:437–449.

Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H & Werren JH (2006b). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Appl Environ Microbiol 72:7098-110.

Baldo L, Lo N & Werren JH (2005). Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. J. Bacteriol 187:5406-5418.

Baldo L, Prendini L, Corthals A & Werren JH (2007). *Wolbachia* are present in Southern African scorpions and cluster with supergroup F. Curr Microbiol 55:367–373.

Baker CR, Blackman RL & Claridge MF (1972). Studies on *Haltica carduorum* GUERIN (Coleoptera, Chrysomelidae), an alien beetle released in Britain as a contribution to the biological control of creeping thistle, *Cirsium arvense* (L.) Scop J Appl Ecol 9:819-830.

Ballard JWO & Whitlock MC (2004). The incomplete natural history of mitochondria. Mol Ecol 13:729–744.

Bandi C, Anderson TJC, Genchi C & Blaxter ML (1998). Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. Proc Biol Sci 265:2407–2413.

Bargues MD, Horak P, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier-Brook C,Mas-Coma S (2003). Insights into the relationships of Palaearctic and Nearctic lymnaeids (Mollusca: Gastropoda) by rDNA ITS-2

sequencing and phylogeny of stagnicoline intermediate host species of *Fasciola hepatica*. Parasite 10:243–255.

Bargues MD, Marcilla A, Ramsey J, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S (2000). Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. Mem Inst Oswado Cruz 95:567–573.

Bargues MD, Morchón R, Latorre JM, Cancrini G, Mas-Coma S & Simón F (2006). Ribosomal DNA second internal transcribed spacer sequence studies of Culicid vectors from an endemic area of *Dirofilaria immitis* in Spain. Parasitol Res 99:205–213.

Bargues MD, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier-Brook C, Mas-Coma S (2001). European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiases, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. Infect Genet Evol 1:85–107.

Baudry E, Bartos J, Emerson K, Whitworth T & Werren JH (2003). *Wolbachia* and genetic variability in the birdnest blowfly *Protocalliphora sialia*. Mol Ecol 12:1843–1854.

Bordenstein SR (2003). Symbiosis and the origin of species. In: Bourtzis K, Miller TM, editors. Insect symbiosis. New York: CRC Press. pp. 283–304.

Bordenstein SR & Rosengaus RB (2005). Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in Isoptera. Curr Microbiol 51:393-398.

Bordenstein SR & Wernegreen JJ (2004). Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*): Infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. Mol Biol Evol 21:981-91.

Bordenstein S R& Werren JH (1998). Effects of A and B *Wolbachia* and host genotype on interspecies cytoplasmic incompatibility in *Nasonia*. Genetics 148:1833-1844.

Bordenstein SR, Marshall ML, Fry AJ, Kim U, Wernegreen JJ (2006). The tripartite associations between bacteriophage, *Wolbachia*, and arthropods. PLoS Pathog 2:e43.

Bordenstein SR, O'Hara FP, Werren JH (2001). *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. Nature 409:707–710.

Bordenstein SR, Paraskevopoulos C, Hotopp JC, Sapountzis P, Lo N, Bandi C, Tettelin H, Werren JH, Bourtzis K (2009). Parasitism and mutualism in *Wolbachia*: what the phylogenomic trees can and cannot say. Mol Biol Evol 26:231-241.

Bouchon D, Rigaud T & Juchault P (1998). Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. Proc R Soc Lond B 265:1081–1090.

Boyle L, O'Neill SL, Robertson HM & Karr TL (1993). Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila.* Science 260:1796-1799.

Braig HR, Zhou W, Dobson SL & O'Neill SL (1998). Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. J. Bacteriol 180:2373–2378.

Breeuwer JAJ & Werren JH (1993). Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. Genetics 135:565-574.

Bressac C & Rousset F (1993). The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: DAPI-staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts. J Invertebr Pathol 61:226-230.

Burzynski A, Zbawicka M, Skibinski DO & Wenne R (2003). Evidence for recombination of mtDNA in the marine mussel *Mytilus trossulus* from the Baltic. Mol Biol Evol 20:388–392.

Callaini C, Dallai R & Riparbelli MG (1997). *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. J. Cell Sci 110:271-280.

Casiraghi M, Bain O, Guerrero R, Martin C, Pocacqua V, Gardner SL, Franceschi A & Bandi C (2004). Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. Int J Parasitol 34:191–203.

Casiraghi M, Bordenstein SR, Baldo L, Lo N, Beninati T, Wernegreen JJ, Werren JH & Bandi C (2005). Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. Microbiology 151:4015–4022.

Casiraghi M, Favia G, Cancrini G, Bartoloni A & Bandi C (2001). Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella ozzardi*. Parasitol Res 87:417–420.

Charlat S, Hurst GDD & Merçot H (2003). Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. Trends Genet 19:217-223.

Clancy DJ & Hoffmann AA (1998). Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. Entomol Exp Appl 86:13-24.

Coleman AW (2007). Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. Nucleic Acids Res 35:3322-3329.

Cook MJ & Butcher RDJ (1999). The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. Res Popul Ecol 41:15-28.

Cordaux, R, Michel-Salzat, A, Bouchon, D (2001). *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. J Evol Biol 14:237–243.

Covacin C & Barker SC (2007). Supergroup F *Wolbachia* bacteria parasitise lice (Insecta: Phthiraptera). Parasitol Res 100:479–485.

Coyne JA & Orr HA (2004). Speciation. Sinauer associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.

Croucher PJP, Oxford GS & Searle JB (2004). Mitochondrial differentiation, introgression and phylogeny of species in the *Tegenaria atrica* group (Araneae: Agelenidae). Biol J Linn Soc 81:79–89.

Czarnetzki AB & Tebbe CC (2004). Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. Environ Microbiol 6:35–44.

Dean JL & Dobson SL (2004). Characterization of *Wolbachia* infections and interspecific crosses of *Aedes* (*Stegomyia*) *polynesiensis* and *Ae*. (*Stegomyia*) *riversi* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 41:894-900.

Dedeine F, Vavre F, Fleury F, Loppin B, Hochberg ME & Boulétreau M (2001). Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. Proc Natl Acad Sci USA 98:6247-6252.

Dobler S & Farrell BD (1999). Host use evolution in *Chrysochus* milkweed beetles: evidence from behaviour, population genetics and phylogeny. Mol Ecol 8:1297-1307.

Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR, Jones BF, Zhou W, Rousset F & O'Neill SL (1999). *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. Insect Biochem Mol Biol 29:153–160.

Dobson SL, Marsland EJ & Rattanadeckakul W (2002). Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. Genetics 160:1087-1094.

Doguet S (1994). Coléotères, Chrysomelidae, Vol. 2, Alticinae. Féderation Française des Sociétés de Sciences Naturelles, Paris.

Dowling TE & Secor CL (1997). The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. Annu. Rev Ecol Syst 28:593–620.

Dunn AK & Stabb EV (2005). Culture-independent characterization of the microbiota of the ant lion *Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). Appl. Environ. Microbiol. 71:8784–8794.

Dunning Hotopp JC, Clark ME, Oliveira DCSG, Foster JM, Fischer P, Muñoz Torres MC, Giebel JD, Kumar N, Ishmael N, Wang S, Ingram J, Nene RV, Shepard J, Tomkins J, Richards S, Spiro DJ, Ghedin E, Slatko BE, Tettelin H & Werren JH (2007). Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. Science 317:1753–1756.

Duron O, Bouchon D, Boutin S, Bellamy L, Zhou L, Engelstädter J & Hurst GDD (2008). The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. BMC Biol 6:27.

Dyer KA & Jaenike J (2004). Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes. Genetics 168:1443–1455.

Dyson EA & Hurst GDD (2004). Persistence of an extreme sex-ratio bias in a natural population. Proc Nat Sci USA 101:6520-6523.

Dyson EA, Kamath MK & Hurst GDD (2002). *Wolbachia* infection associated with all-female broods in *Hypolimnas bolina* (Lepidoptera: Nymphalidae): evidence for horizontal transmission of a butterfly male killer. Heredity 88:166–171.

Eberhard W, Achoy R, Marin MC & Ugalde J (1993). Natural history and behavior of two species of *Macrohaltica* (Coleoptera: Chrysomelidae). Psyche 100:93-119.

Elder JF & Turner BJ (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. Q Rev Biol 70:297–320.

Espino CI, Gómez T, González G, Brazil do Santos MF, Solano J, Sousa O, Moreno N, Windsor D, Ying A, Vilchez S & Osuna A (2009). Detection of *Wolbachia* bacteria in multiple organs and feces of the triatomine insect *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae). Appl Environ Microbiol 75:547–550.

Excoffier L, Laval G & Schneider S (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinf Online 1:47-50.

Fabry S, Köhler A & Coleman AW (1999). Intraspecies analysis: comparison on ITS sequence data and gene intron sequence data with breeding data for a worldwide collection of *Gonium pectorale*. J Mol Evol 48:94–101.

Fallon AM (2008). Cytological properties of an *Aedes albopictus* mosquito cell line infected with *Wolbachia* strain *w* AlbB. In Vitro Cell Dev Biol Anim 44:1071-2690.

Fenn K & Blaxter M (2006). *Wolbachia* genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. Trends Parasitol 22:60-65.

Fialho RF & Stevens L (2000). Male-killing in a flour beetle. Proc R Soc Lond B 267:1469-1474.

Fontaine KM, Cooley JR & Simon C (2007). Evidence for paternal leakage in hybrid periodical cicadas (Hemiptera: *Magicicada* spp.). PLoS ONE 2:e892.

Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, Ivanova N, Bhattacharyya A, Kapatral V, Kumar S, Posfai J, Vincze T, Ingram J, Moran L, Lapidus A, Omelchenko M, Kyrpides N, Ghedin E, Wang S, Goltsman E, Joukov V, Ostrovskaya O, Tsukerman K, Mazur M, Comb D, Koonin E & Slatko B (2005). The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. PLoS Biol 3:e121.

French DM, Brown WC & Palmer GH (1999). Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. Infect Immun 67:5834–40.

Fritz GN, Conn J, Cockburn A & Seawright J (1994). Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). Mol Biol Evol 11:406–416.

Frydman HM, Li JM, Robson DN & Wieschaus E (2006). Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. Nature 441:509-512.

Fujii Y, Kageyamad, Hoshizaki S, Ishikawa H & Sasaki T (2001). Transfection of *Wolbachia* in Lepidoptera: the feminizer of the adzuki bean borer *Ostrinia scapulalis* causes male killing in the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella.* Proc R Soc Lond B 268:855-859.

Funk DJ & Omland KE (2003). Species level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. A Rev Ecol Evol Syst 34:397-423.

Furth DG (1994). A new case of parthenogenesis in beetles: *Longitarsus melanurus* (Melsheimer) (Coleoptera: Chrysomelidae). J New York Entomol Soc 102:310-317.

Furth DG, Traub W & Harpaz I (1983). What makes *Blepharida* jump? A structural study of the metafemoral spring of a flea beetle. J Exp Zool Part A 227:43-47.

Ganley ARD & Kobayashi T (2007). Highly efficient concerted evolution in the ribosonal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. Genome Res 17:184–191.

Gantenbein B, Fet V, Gantenbein-Ritter IA & Balloux F (2005). Evidence for recombination in scorpion mitochondrial DNA (Scorpiones: Buthidae). Proc R Soc Lond Ser B 272:697–704.

Gavotte L, Vavre F, Henri H, Ravallec M, Stouthamer R & Boulétreau M (2004). Diversity, distribution, and specificity of WO phage infection in *Wolbachia* in four insect species. Insect Mol Biol 13:147-53.

Gazla IN & Carracedo MC (2009). Effect of intracellular *Wolbachia* on interspecific crosses between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans.* Genet Mol Res 8:861-869.

Ghelelovitch S (1952). Sur le déterminisme génétique de la sterilité dans le croisement entre differentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. C R Acad Sci Paris 24:2386–2388.

Giorgini M, Monti MM, Caprio E, Stouthamer R & Hunter MS (2009). Feminization and the collapse of haplodiploidy in an asexual parasitoid wasp harboring the bacterial symbiont *Cardinium*. Heredity 102:365-371.

Girin C & Boulétreau M (1995). Microorganism-associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma bourarachae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Cell Mol Life Sci 51:398-401.

Gómez-Zurita J, Juan C & Petitpierre E (2000). Sequence, secondary structure and phylogenetic analyses of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in the *Timarcha* leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). Insect Mol Biol 9:591-604.

Gómez-Zurita J, Vogler AP & Funk DJ (2004). Diagnosing an overlooked North American taxon: biological observations and mitochondrial insights on *Calligrapha suturella* Schaeffer, 1933 new status (Coleoptera, Chrysomelidae). Ann Entomol Soc Am 97:28–36.

Gompert Z, Forister ML, Fordyce JA & Nice CC (2008). Widespread mito-nuclear discordance with evidence for introgressive hybridization and selective sweeps in *Lycaeides.* Mol Ecol 17:5231–5244.

Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Werren JH & Karr TL (2002). Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). J Invertebr Pathol 81:166–174.

Gross BL & Rieseberg LH (2005). The ecological genetics of homoploid hybrid speciation. J Hered 96:241–252.

Guo X, Liu S & LiuY (2006). Evidence for recombination of mitochondrial DNA in triploid crucian carp. Genetics 172:1745–1749.

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A & Wilson AC (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. Nature 352:255–257.

Hagimori T, Yoshihisa A, Date S & Miura K (2006). The first finding of a *Rickettsia* bacterium associated with parthenogenesis induction among insects. Curr Microbiol 52:97–101.

Haine ER & Cook JM (2005). Convergent incidences of *Wolbachia* infection in fig wasp communities from two continents. Proc R Soc Lond B 272:421–429.

Haldane JBS (1922). Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. J Genet 12:101–109.

Harris DJ & Crandall KA (2000). Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for phylogenetic and microsatellite studies. Mol Biol Evol 17:284–291.

Hatch MH (1971). The Beetles of the Pacific Northwest. Part V. University of Washington Press, Seattle.

Heath DH, Butcher RDJ, Whitfield WGF & Hubbard SF (1999). Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. Curr Biol 9:313-316.

Hertig M (1936). The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. Parasitology 28:453–486.

Hertig M & Wolbach SB (1924). Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. J Med Res 44:329–374.

Hey J (2000). Human mitochondrial DNA recombination: can it be true? Trends Ecol Evol 15:181–182.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A & Werrren JH (2008). How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. FEMS Microbiol Lett 281:215-220.

Hiroki M, Kato Y, Kamito T & Miura K (2002). Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). Naturwissenschaften 89:167-170.

Hoarau G, Holla S, Lescasse R, Stam WT & Olsen JL (2002). Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus*. Mol Biol Evol 19:2261–2264.

Hoffmann AA (1988). Partial cytoplasmic incompatibility between two Australian populations of *Drosophila melanogaster*. Entomol Exp Appl 48:61-67.

Hoffmann AA & Turelli M (1988). Unidirectional incompatibility in *Drosophila simulans:* inheritance, geographic variation and fitness effects. Genetics 119:435-444.

Hoffmann AA & Turelli M (1997). Cytoplasmic incompatibility in insects, pp. 42-80 in *Influential Passengerns: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*, edited by S.L. O'Neill, A.A. Hoffmann and J.H. Werren. Oxford University Press, Oxford.

Hoffmann AA, Hercus M & Dagher H (1998). Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. Genetics 148:221-231.

Hoffmann AA, Reynolds KT, Michael A. Nash MA & Weeks AR (2008). A high incidence of parthenogenesis in agricultural pests. Proc R Soc Lond B 275:2473–2481.

Hoffmann AA, Turelli M & Harshman LG (1990). Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. Genetics 126:933-948.

Hoffmann AA, Turelli M & Simmons M (1986). Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. Evolution 40:692-701.

Hoy MA, Nguyen R & Jeyaprakash A (1999). Classical biological control of Asian citrus psylla. Citrus Ind 80:20-22.

Huigens ME, de Almeida RP, Boons PAH, Luck RF & Stouthamer R (2004). Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. Proc R Soc Lond B 271:509–515.

Huigens ME, Luck RF, Klaassen RHG, Maas MFPM, Timmermans MJTN & Stouthamer R (2000). Infectious parthenogenesis. Nature 405:178-179.

Hurst GDD & Jiggins FM (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. Proc R Soc Lond B 272:1525–1534.

Hurst GDD & Schilthuizen M (1998). Selfish genetic elements and speciation. Heredity 80:2-8.

Hurst GDD, Hammarton TC, Bandi C, Majerus TMO, Bertrand D & Majerus MEN (1997). The diversity of inherited parasites of insects: the male-killing agent of the ladybird beetle *Coleomegilla maculata* is a member of the Flavobacteria. Genet Res 70:1-6.

Hurst GDD, Jiggins FM & Majerus MEN (2003). Inherited microorganisms that selectively kill male hosts: The hidden players of insect evolution?, pp. 177–198 in *Insect Symbiosis*, edited by K. Bourtzis & T. A. Miller. CRC Press, Boca Raton, FL.

Hurst GDD, Bandi C, Sacchi L, Cochrane AG, Bertrand D, Karaca I & Majerus ME (1999a). *Adonia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) bears maternally inherited flavobacteria that kill males only. Parasitology 118:125-34.

Hurst GDD, Jiggins FM, Schulenburg JHGvd, Bertrand D, Werren JH, West S, Goriacheva II, Zakharov IA, Southamer R & Majerus MEN (1999b). Male killing *Wolbachia* in two species of insects. Proc R Soc Lond B 266:735-740.

Hurst GDD, Johnson AP, Schulenburg JHGvd & Fuyama Y (2000). Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. Genetics 156:699–709.

Hurst GDD, Schulenburg JHGvd, Majerus TMO, Bertrand D, Zakarov IA, Baungaard J, Völkl W, Stouthamer R & Majerus MEN (1999c). Invasion of one insect species, *Adalia bipunctata*, by two different male-killing bacteria. Insect Mol Biol 8:133–139.

Ijichi N, Kondo N, Matsumoto R, Shimada M, Ishikawa H & Fukatsu T (2002). Internal spatiotemporal population dynamics of infection with three *Wolbachia* strains in the adzuki bean beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). Appl Environ Microbiol 68:4074–4080.

Jäckel R (2005). Phylogenetische Untersuchung der Flohkäfergattung *Altica* (Chrysomelidae, Alticinae) anhand von DNA-Sequenzen. Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Jaenike J (2007). Spontaneous emergence of a new *Wolbachia* phenotype. Evolution 61:2244–2252.

James AC, Dean MD, McMahon ME & Ballard JWO (2002). Dynamics of double and single *Wolbachia* infections in *Drosophila simulans* from New Caledonia. Heredity 88:182–189.

Jansen VAA, Turelli M & Godfray HCJ (2008). Stochastic spread of *Wolbachia*. Proc R Soc Lond B 275:2769-2776.

Jeyaprakash A & Hoy MA (2000). Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. Insect Mol Biol 9:393-405.

Jiggins FM (2003). Male-Killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. Genetics 164:5–12.

Jiggins FM, Hurst GDD, Dolman CE & Majerus, MEN (2000a). High prevalence male-killing *Wolbachia* in the butterfly *Acraea encedana*. J Evol Biol 13:495-501.

Jiggins FM, Hurst GDD, Jiggins CD, Schulenburg JHGvd & Majerus, ME (2000b). The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing *Spiroplasma* bacterium. Parasitology 120:439–446.

Jiggins FM, Hurst GDD & Majerus MEN (2000c). Sex ratio distorting *Wolbachia* cause sex role reversal in their butterfly hosts. Proc R Soc Lond B 267:69-73.

Jiggins FM, Hurst GD, Schulenburg JHGvd & Majerus ME (2001a). Two male-killing *Wolbachia* strains coexist within a population of the butterfly *Acraea encedon*. Heredity 86:161–166.

Jiggins FM, Schulenburg JHGvd, Hurst GDD & Majerus MEN (2001b). Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. Proc R Soc Lond B 268:1423-1427.

Jiggins FM, Randerson JP, Hurst GDD & Majerus MEN (2002). How can sex ratio distorters reach extreme prevalences? Male-killing *Wolbachia* are not suppressed and have near-perfect vertical transmission efficiency in *Acraea encedon*. Evolution 56:2290-2295.

Juchault P, Frelon M, Bouchon D & Rigaud T (1994). New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods: evolutionary implications. C R Acad Sci Paris 317:225–230.

Kageyama D, Anbutsu H, Watada M, Hosokawa T, Shimada M & Fukatsu T (2006). Prevalence of a non-male-killing spiroplasma in natural populations of *Drosophila hydei*. Appl Environ Microbiol 72:6667–6673.

Kangas E & Rutanen I (1992). Identification of females of the Finnish species of *Altica* Müller (Coleoptera, Chrysomelidae). Ent Fenn 4:115-129.

Keller GP, Windsor DM, Saucedo JM & Werren JH (2004). Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the Neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae, Cassidinae). Mol Ecol 13:2405–2420.

Kikuchi Y & Fukatsu T (2003). Diversity of *Wolbachia* endosymbionts in heteropteran bugs. Appl Environ Microbiol 69:6082–6090.

Kondo R, Satta Y, Matsuura ET, Ishiwa H, Takahata N & Chigusa SI (1990). Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. Genetics 126:657–663.

Kondo N, Shimada M & Fukatsu T (2005). Infection density of *Wolbachia* endosymbiont affected by co-infection and host genotype. Biol Lett 1:488–491.

Koop JL, Zeh DW, Bonilla MM & Zeh JA (2009). Reproductive compensation favours male-killing *Wolbachia* in a live-bearing host. Proc R Soc Lond B 276:4021-4028.

Kraytsberg Y, Schwartz M, Brown TA, Ebralidse K, Kunz WS, Clayton DA, Vissing J, Khrapko K (2004). Recombination of human mitochondrial DNA. Science 304:981.

Kvist L, Martens J, Nazarenko AA & Orell M (2003). Paternal leakage of mitochondrial DNA in the Great Tit (*Parus major*). Mol Biol Evol 20:243–247.

Kyei-Poku GK, Floate KD, Benkel B & Goettel MS (2003). Elimination of *Wolbachia* from *Urolepis rufipes* (Hymenoptera: Pteromalidae) with heat and antibiotic treatments: implications for host reproduction. Biocontrol Science and Technology 13:341-354.

Lachowska D, Rozek M & Holecová M (2008). New data on the cytology of pathenogenetic weevils (Coleoptera, Curculionidae). Genetica 134:235-242.

Ladoukakis ED & Zouros E (2001). Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. Mol Biol Evol 18:1168–1175.

Lansman RA, Avise JC & Huettel MD (1983). Critical experimental test of the possibility of 'paternal leakage' of mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci USA 80:1969–1971.

Lawson ET, Mousseau TA, Klaper R, Hunter MD & Werren JH (2001). *Rickettsia* associated with male-killing in a buprestid beetle. Heredity 86:497–505.

Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C & Bandi C (2002). How many *Wolbachia* supergroups exist? Mol Biol Evol 19:341–346.

Lunt DH & Hyman BC (1997). Animal mitochondrial DNA recombination. Nature 387:247.

Machado CA & Hey J. (2003). The causes of phylogenetic conflict in a classic *Drosophila* species group. Proc Biol Sci 270:1193-202.

Maddison, W. P. (1997). Gene trees in species trees. Syst Biol 46:523-536.

Magoulas A & Zouros E (1993). Restriction-site heteroplasmy in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA. Mol Biol Evol 10:319–325.

Majerus TM, von der Schulenburg JHG, Majerus ME & Hurst GD (1999). Molecular identification of a male-killing agent in the ladybird *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). Insect Mol Biol 8:551–555.

Malloch G & Fenton B (2005). Super-infections of *Wolbachia* in byturid beetles and evidence for genetic transfer between A and B super-groups of *Wolbachia*. Mol Ecol 14:627–637.

Mas-Coma S, Funatsu IR & Bargues MD (2001). *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. Parasitology 123:115–127.

Mateos M, Castrezana SJ, Nankivell BJ, Estes AM, Markow TA & Moran NA (2006). Heritable endosymbionts of *Drosophila*. Genetics 174:363–376.

Maulik S (1929). On the structure of the hind femur in halticine beetles. Proc Zool Soc Lond 2:305-308.

Maváres J & Linares M (2008). Homoploid hybrid speciation in animals. Mol Ecol 17:4181–4185.

Mavingui P, Van VT, Labeyrie E, Rancès E, Vavre F & Simonet P (2005). Efficient procedure for purification of obligate intracellular *Wolbachia pipientis* and representative amplification of its genome by multiple-displacement amplification. Appl Environ Microbiol 71:6910–6917.

McGraw EA & O'Neill SL (2004). *Wolbachia pipientis*: Intracellular infection and pathogenesis in *Drosophila*. Curr Opin Microbiol 7:67–70.

Miller BR, M. B., Crabtree MB & Savage HM (1996). Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Insect Mol Biol 5:93–107.

Mitsuhashi W, Saiki T, Wei W, Kawakita H & Sato M (2002). Two novel strains of *Wolbachia* coexisting in both species of mulberry leafhoppers. Insect Mol Biol 11:577–584.

Mohan Nair MK & Venkitanarayanan K (2007). Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. Pediatr Res 62:664–69.

Mohr, K. H. (1966). Chrysomelidae. - In: Freude, H., Harde, K. W. & Lohse, G. A. (Hrsg.): Die Käfer Mitteleuropas. Bd. 9. Krefeld.

Montenegro H, Solferini VN, Klaczko LB & Hurst GDD (2005). Male killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. Insect Mol Biol 14:281–287.

Moore (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. Evolution 49:718-726.

Mora D (2006). Untersuchungen zur Spezifität und möglichen Funktion endosymbiontischer *Wolbachia* (α-Proteobakteria) bei Blattkäfern der Gattung *Altica* GEOFFROY 1762 (Coleoptera, Chrysomelidae). Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Morris WF, Wiser SD & Klepetka B (1992). Causes and consequences of spatial aggregation in the phytophagous beetle *Altica tombacina*. J Anim Ecol 61:49-58.

Mouton L, Dedeine F, Henri H, Boulétreau, Profizi N & Vavre F (2004). Virulence, multiple infections and regulation of symbiotic population in the *Wolbachia-Asobara tabida* symbiosis. Genetics 168:181–189.

Naisbit RE, Jiggins CD, Linares M, Salazar C & Mallet J (2002). Hybrid sterility, Haldane's rule and speciation in *Heliconius cydno* and *H. melpomene*. Genetics 161:1517–1526.

Narita S, Nomura M & Kageyama D (2007). Naturally occurring single and double infection with *Wolbachia* strains in the butterfly *Eurema hecabe*: transmission efficiencies and population density dynamics of each *Wolbachia* strain. FEMS Microbiol Ecol 61:235–245.

Narita S, Nomura M, Kato Y & Fukatsu T (2006). Genetic structure of sibling butterfly species affected by *Wolbachia* infection sweep: evolutionary and biogeographical implications. Mol Ecol 15:1095–1108.

Negri I, Pellecchia M, Mazzoglio PJ, Patetta A & Alma A (2006). Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/XO sex determination system. Proc R Soc Lond B 273:2409-2416.

Noda H, Koizumi Y, Zhang Q, & Deng K (2001). Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. Insect Biochem Mol Biol 31:727–737.

Noh SM, Brayton KA, Knowles DP, Agnes JT, Dark MJ, Wendy CB, Baszler TV & Palmer GH (2006). Differential expression and sequence conservation of the *Anaplasma marginale* msp2 gene superfamily outer membrane proteins. Infect Immun 74:3471–79.

Normark BB (1996). Polyploidy of parthenogenetic *Aramigus tesselatus* (SAY) (Coleoptera: Curculionidae). Col Bull 50:73-79.

O'Neill SL & Karr TL (1990). Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. Nature 348:178–180.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL & Robertson HM (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. Proc Natl Acad Sci USA 89:2699-2702.

van Opijnen T & Breeuwer JAJ (1999). High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider-mite. Exp Appl Acarol 23:871-881.

van Opijnen T, Baudry E, Bartos J, Baldo L, Werren JH (2005). Genetic variability in three genomes of *Nasonia*: nuclear, mitochondrial and Wolbachia. Insect Mol Biol 14:653–663.

Orr HA (1997). Haldane's rule. Annu Rev Ecol Syst 28:195–218.

Orr HA & Irving S (2005). Segregation distortion in hybrids between the Bogota and USA subspecies of *Drosophila pseudoobscura.* Genetics 169:671–682.

Panaram K & Marshall JL (2007). F supergroup *Wolbachia* in bush crickets: what do patterns of sequence variation reveal about this supergroup and horizontal transfer between nematodes and arthropods? Genetica 130:53–60.

Pannebakker BA, Pijnacker LP, Zwaan BJ & Beukeboom LW (2004). Cytology of *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera: Figitidae). Genome 47:299-303.

Paraskevopoulos C, Bordenstein SR, Wernegreen JJ, Werren JH & Bourtzis K (2006). Toward a *Wolbachia* Multilocus Sequence Typing System: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. Curr Microbiol 53:388–395.

Perrot-Minnot MJ & Werren JH (1999). *Wolbachia* infection and incompatibility dynamics in experimental selection lines. J Evol Biol 12:272–282.

Perrot-Minnot MJ, Guo LR & Werren JH (1996). Single and double infections with *Wolbachia* in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: effects on compatibility. Genetics 143:961-972.

Pfaff A (2010). Vergleich der Darmmikroben zweier Flohkäferarten (Chrysomelidae, Alticinae, *Longitarsus*) aus unterschiedlichen Habitaten - Einfluss Wirtspflanze, Boden und Käferart. Bachelorarbeit, Universität Hamburg.

Phillips WM (1977). Modification of feeding 'preference' in the flea-beetle, *Haltica lythri* (Coleoptera, Chrysomelidae). Ent Exp & Appl 21:71-80.

Phillips WM (1979). A contribution to the study of species relations within the chrysomelid genus *Altica* Müller in Britain. Zool J Linn Soc 66:289-308.

Piganeau G, Michael Gardner M & Eyre-Walker A (2004). A broad survey of recombination in animal mitochondria. Mol Biol Evol 21:2319–2325.

Pike N & Kingcombe R (2009). Antibiotic treatment leads to the elimination of *Wolbachia* endosymbionts and sterility in the diplodiploid collembolan *Folsomia candida*. BMC Biology 7:54.

Plantard O, Rasplus JY, Mondor G, Le Clainche I & Solignac M (1998). *Wolbachia*-induced thelytoky in the rose gallwasp *Diplolepis spinosissimae* (Giraud) (Hymenoptera: Cynipidae), and its consequences on the genetic structure of its host. Proc R Soc Lond B 265:1075-1080.

Poinsot D, Bourtzis K, Markakis G, Savakis C & Mercot H (1998). *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. Genetics 150:227–237.

Pool JE, Wong A, Aquadro CF (2006). Finding of male-killing *Spiroplasma* infecting *Drosophila melanogaster* in Africa implies transatlantic migration of this endosymbiont. Heredity 97:27–32.

Posada D & Crandall KA (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14:817–818.

Poulton EB (1923). All female families of *Hypolimnas bolina* L., bred in Fiji by H. W. Simmonds. Proc R Ent Soc Lond 1923:9–12.

Prowell DP, McMichael M & Silvain JF (2004). Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). Ann Ent Soc Am 97:1034-1044.

Rasgon JL, Gamston C & Ren X (2006). Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium. Appl Environ Microbiol 72:6934–6937.

Raychoudhury R, Baldo L, Oliveira DCSG & Werren JH (2008). Modes of acquisition of *Wolbachia*: Horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. Evolution 63:165–183.

Raychoudhury R, Grillenberger BK, Gadau J, BijlsmaR, van de Zande L, Werren JH & Beukeboom LW (2010). Phylogeography of *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera) indicates a mitochondrial-*Wolbachia* sweep in North America. Heredity 104:318-326.

Reed KM & Werren JH (1995). Induction of paternal genome loss by the paternal-sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): A comparative-study of early embryonic events. Mol Reprod Dev 40:408-418.

Reichholf J (1974). Vorkommen und Biologie des Blattkäfers *Altica tamaricis* am Sanddorn an den Inndämmen. Mitt Zool Ges Braunau 2:19-23.

Renken W (1956). Untersuchungen über Winterlager der Insekten. Z Morph u Ökol Tiere 45:34-106.

Reuter M & Keller L (2003). High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. Mol Biol Evol 20:748–753.

Reynolds KT & Hoffmann AA (2002). Male age, host effects and the weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia.* Genet Res 80:79-87.

Reynolds KT, Thomson LJ & Hoffmann AA (2003). The effects of host age, host nuclear background and temperature on phenotypic effects of the virulent Wolbachia strain popcorn in Drosophila melanogaster. Genetics 164:1027-1034.

Riegler M, Sidhu M, Miller WJ & O'Neill SL (2005). Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. Curr Biol 15:1428–1433.

Rigaud T (1997). Inherited microorganisms and sex determination of arthropod hosts, p. 81–101. *In* S. L. O'Neill, A. A. Hoffmann & J. H. Werren (ed.), *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*. Oxford University Press, New York, NY.

Rigaud T & Juchault P (1995). Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. J Evol Biol 8:249-255.

Rigaud T, Bouchon D, Souty-Grosset C & Raimond R (1999a). Mitochondrial DNA polymorphism, sex ratio distorters and population genetics in the isopod *Armadillidium vulgare*. Genetics 152:1669-1677.

Rigaud T, Moreau J & Juchault P (1999b). *Wolbachia* infection in the terrestrial isopod *Oniscus asellus*: sex ratio distortion and effect on fecundity. Heredity 83:469-475.

Rigaud T, Souty-Grosset C, Raimond R, Mocquard J & Juchault P (1991). Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent acquisitions. Endocytobiosis Cell Res 7:259–273.

Robertson JG (1966). The chromosomes of bisexual and parthenogenetic species of *Calligrapha* (Coleoptera: Chrysomelidae) with notes on sex ratio, abundance and egg number. Can J Genet Cytol 8:695–732.

Roehrdanz R, Olson D, Bourchier R, Sears S, Cortilet A & Fauske G (2006). Mitochondrial DNA diversity and *Wolbachia* infection in the flea beetle *Aphthona nigriscutis* (Coleoptera: Chrysomelidae): An introduced biocontrol agent for leafy spurge. Biol Control 37:1-8.

Rokas A (2000). *Wolbachia* as a speciation agent. Trends Ecol Evol 15:44-45.

Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19:1572-1574.

Ros VI, Fleming VM, Feil EJ, Breeuwer JA (2009). How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). Appl Environ Microbiol 75:1036-1043.

Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P & Solignac M (1992). *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. Proc R Soc Lond B 250:91-98.

Rowley SM, Raven RJ & McGraw EA (2004). *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. Curr Microbiol 49:208–214.

Sakamoto JM, Feinstein J & Rasgon JL (2006). *Wolbachia* infections in the Cimicidae: museum specimens as an untapped resource for endosymbiont surveys. Appl Environ Microbiol 72:3161–3167.

Sanchis A, Michelena JM, Latorre A, Quicke DLJ, Gärdenfors U & Belshaw R (2001). The phylogenetic analysis of variable-length sequence data: Elongation Factor–1α introns in European populations of the parasitoid wasp genus *Pauesia* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). Mol Biol Evol 18:1117-1131.

Sanger F, Nicklein S & Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467.

Saridaki A & Bourtzis K (2010). *Wolbachia*: more than just a bug in insect genitals. Curr Opin Microbiol 13:67-72.

Sasaki T & Ishikawa H (2000). Transinfection of *Wolbachia* in the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, by embryonic microinjection. Heredity 85:130-135.

Sasaki T, Kubo T & Ishikawa H (2002). Interspecific transfer of *Wolbachia* between two lepidopteran insects expressing cytoplasmic incompatibility: a *Wolbachia* variant naturally infecting *Cadra cautella* causes male killing in *Ephestia kuehniella.* Genetics 162:1313-1319.

Satta Y, Toyohara N, Ohtaka C, Tatsuno Y, Watanabe TK, Matsuura ET, Chigusa SI & Takahata N (1988). Dubious maternal inheritance of mitochondrial DNA in *D. simulans* and evolution of *D. mauritiana*. Genet Res 52:1–6.

Saura A, Lokki J & Suomalainen E (1993). Origin of polyploidy in parthenogenetic weevils. J Theor Biol 163:449–456.

Schilthuizen M & Stouthamer R (1997). Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in T*richogramma* wasps. Proc R Soc Lond B 264:361-366.

Schmidt BC & Sperling FAH (2008). Widespread decoupling of mtDNA variation and species integrity in *Grammia* tiger moths (Lepidoptera: Noctuidae). Syst Entomol 33:613–634.

Schulenburg JHGvd, Englisch U & Wägele JW (1999). Evolution of ITS1 rDNA in the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda): 39 end sequence conservation and its phylogenetic utility. J Mol Evol 48:2–12.

Schulenburg JHGvd, Habig M, Sloggett JJ, Webberley KM, Bertrand D, Hurst GDD & Majerus MEN (2001). Incidence of male-killing *Rickettsia* spp. (α-Proteobacteria) in the ten-spot ladybird beetle *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). Appl Environ Microbiol 67:270–277.

Schulenburg JHGvd, Hurst GDD, Huigens TME, van Meer MMM, Jiggins FM, Majerus MEN (2000). Molecular evolution and phylogenetic utility of *Wolbachia ftsZ* and *wsp* gene sequences with special reference to the origin of male-killing Mol Biol Evol 17:584-600.

Schulenburg JHGvd, Hurst GDD, Tetzlaff D, Booth GE, Zakharov IA & Majerus MEN (2002). History of infection with different male-killing bacteria in the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata* revealed through mitochondrial DNA sequence analysis. Genetics 160:1075–1086.

Schwartz M & Vissing J (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. N Engl J Med 347:576–580.

Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F & Sullivan W (2008). The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. Annu Rev Genet 42:683–707.

Swofford, D. L. (2002). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other Methods), Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, M.A.

Segarra C & Petitpierre E (1982). Preliminary data on the chromosomes of European Alticinae (Coleoptera, Chrysomelidae). Spixiana (Munich) suppl 7:29-37.

Shoemaker DD, Ahrens M, Sheill L, Mescher M, Keller L & Ross KG (2003). Distribution and Prevalence of *Wolbachia* Infections in Native Populations of the Fire Ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). Environ Entomol 32:1329-1336.

Shoemaker DD, Katju V & Jaenike J (1999). *Wolbachia* and the evolution of reproductive isolation between *Drosophila recens* and *Drosophila subquinaria*. Evolution 53:1157-1164.

Siede D (1998). Bestimmungshilfe für die mitteleuropäischen *Altica*-Arten (Coleoptera, Chrysomelidae). Ent Bl 94:77-90.

Simon JC, Delmotte F, Rispe C & Crease T (2003). Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual rel atives: the possible routes to parthenogenesis in animals. Biol J Linn Soc 79:151–163.

Sintupachee S, Milne JR, Poonchaisri S, Baimai V & Kittayapong P (2006). Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. Microb Ecol 51:294–301.

Skibinski DOF, Gallagher C & Beynon CM (1994). Mitochondrial DNA inheritance. Nature 368:817–818.

Smith SG (1960). Chromosome numbers of Coleoptera. II. Can J Genet Cytol 2:67-88.

Smith SG (1971). Parthenogenesis and polyploidy in beetles. Am Zoologist 11:341-349.

Smith SG & Virkki N (1978). Animal cytogenetics, vol 3: Insecta. Part 5: Coleoptera. Borntraeger, Berlin.

Sota T, Ishikawa R, Ujiie M, Kusumoto F & Vogler AP (2001). Extensive trans-species mitochondrial polymorphisms in the carabid beetles *Carabus* subgenus *Ohomopterus* caused by repeated introgressive hybridization. Mol Ecol 10:2833-2847.

Stahlhut JK, Desjardins CA, Clark ME, Baldo L, Russell JA, Werren JH & Jaenike J (2010). The mushroom habitat as an ecological arena for global exchange of *Wolbachia*. Mol Ecol 19:1940–1952.

Stevens L & Wicklow DT (1992). Multispecies interactions affect cytoplasmic incompatibility in *Tribolium* flour beetles. Am Nat 140:642-653.

Stouthamer R (1997). *Wolbachia*-induced parthenogenesis. In *Influential passengers: inherited microorganisms and invertebrate reproduction* (ed. S. L. O'Neill, A. A. Hoffmann & J. H. Werren). Oxford University Press, NewYork.

Stouthamer R & Kazmer DJ (1994). Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. Heredity 73:317-327.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ & Hurst GDD (1999). *Wolbachia pipientis*: micribial manipulator of arthropod reproduction. Annu Rev Microbiol 53:71-102.

Stouthamer R, Luck RF & Hamilton WD (1990). Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. Proc Natl Acad Sci USA 87:2424–2427.

Strüven L (2008). Wolbachien-Diversität und Befallsraten bei *Altica oleracea* (Chrysomelidae, Alticinae). Bachelorarbeit, Universität Hamburg.

Sullivan J & Jaenike J (2006). Male-killing *Wolbachia* and male mate choice: a test with *Drosophila innubila*. Evol Ecol Res 8:91-102.

Sullivan JP, Lavoue S, Arnegard ME & Hopkins CD. (2004). AFLPs resolve phylogeny and reveal mitochondrial introgression within a species flock of African electric fish (Mormyroidea: Teleostei). Evolution 58:825-841.

Sun X, Cui L & Li Z (2007). Diversity and phylogeny of *Wolbachia* infecting *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) populations from China. Environ Entomol 36:1283-1289.

Suomalainen E, Saura A & Lokki J (1987). Cytology and evolution in parthenogenesis. CRC Press, Boca Raton, Florida

Tagami Y & Miura K (2004). Distribution and prevalence of *Wolbachia* in Japanese populations of Lepidoptera. Insect Mol Biol 13:359–364.

Tao Y, Hartl DL & Laurie CC (2001). Sex-ratio segregation distortion associated with reproductive isolation in Drosophila. Proc Natl Acad Sci USA 98:13183–13188.

Taylor MJ & Hoerauf A (1999). *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. Parasitol Today 15:437–442.

Teixeira L, Ferreira A & Ashburner M (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. PLoS Biology 6:e1000002.

Telschow A, Hammerstein P & Werren JH (2005). The effects of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. Evolution 59:1607–1619.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25:4876-4882.

Timmermans MJTN & Ellers J (2009). *Wolbachia* endosymbiont is essential for egg hatching in a parthenogenetic arthropod. Evol Ecol 23:931-942.

Tinsley MC & Majerus MEN (2006). A new male-killing parasitism: *Spiroplasma* bacteria infect the ladybird beetle *Anisosticta novemdecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Parasitology 132:757–765.

Tolasch T & Gürlich S (2010). Verbreitungskarten der Käfer Schleswig-Holsteins und des Niederelbegebietes. - Homepage des Verein für Naturwissenschaftliche Heimatforschung zu Hamburg e.V. [http://www.entomologie.de/hamburg/karten]

Tram U & Sullivan W (2002). Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. Science 296:1124–1126.

Trpis M, Perrone JB, Reissig M & Parker KL (1981). Control of cytoplasmic incompatibility in the *Aedes scutellaris* complex. Heredity 72:313-317.

Tsaousis AD, Martin DP, Ladoukakis ED, Posada D & Zouros E (2005). Widespread recombination in published animal mtDNA sequences. Mol Biol Evol 22:925–933.

Turelli M & Hoffmann AA (1991). Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. Nature 353:440–442.

Turelli M & Hoffmann AA (1995). Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. Genetics 140:1319-1338.

Turelli M, Hoffmann AA & McKechnie SW (1992). Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations. Genetics 132:713–723.

Ujvari B, Dowton M & Madsen T (2007). Mitochondrial DNA recombination in a free-ranging Australian lizard. Biol Lett 3:189–192.

Vaishampayan PA, Dhotre DP, Gupta RP, Lalwani P, Ghate H, Patole MS & Shouche YS (2007). Molecular evidence and phylogenetic affiliations of *Wolbachia* in cockroaches. Mol Phyl Evol 44:1346–1351.

Vala F, Egas M, Breeuwer JAJ & Sabelis MW (2004). *Wolbachia* affects oviposition and mating behaviour of its spider mite host. J Evol Biol 17:692-700.

Vandekerckhove TT, Watteyne S, Bonne W, Vanacker D, Devaere S, Rumes B, Maelfait J, Gillis M, Swings J, Braig H, Mertens J (2003). Evolutionary trends in feminization and intersexuality in woodlice (Crustacea, Isopoda) infected with *Wolbachia pipientis* (α-*Proteobacteria*). Belg J Zool 133:61–69.

Vandekerckhove TT, Watteyne S, Willems S, Swings JG, Mertens J & Gillis M (1999). Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida*

(Hexapoda, Collembola) and its implications for the *Wolbachia* taxonomy. FEMS Microbiol Lett 180:279–286.

Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P & Boulétreau M (1999). Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. Mol Biol Evol 16:1711-1723.

Vavre F, C. Girin C & Boulétreau M (1999). Phylogenetic status of a fecundity-enhancing*Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma.* Insect Mol Biol 8:67–72.

Veneti Z, Clark ME, Zabalou S, Karr TL, Savakis C & Bourtzis K (2003). Cytoplasmic incompatibility and sperm cyst infection in different *Drosophila-Wolbachia* associations. Genetics 164:545–552.

Vogler AP & DeSalle R (1994). Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle, *Cicindela dorsalis*. Mol Biol Evol 11:393–405.

Walsh PS, Metzger DA & Higuchi R (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques 10:506–513.

Wan FH & Harris P (1996). Host finding and recognition by *Altica carduorum*, a defoliator of *Cirsium arvense*. Entomol Exp Appl 80:491-496.

Webb AR, White MJD, Contreras N & Cheney J (1978). Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba* (formerly *Moraba) virgo* and its bisexual relatives. IV. Chromosome Banding Studies. Chromosoma 67:309-339.

Weeks AR & Breeuwer JAJ (2001). *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. Proc R Soc Lond B 268:2245-2251.

Weeks AR, Frantisek M & Breeuwer JAJ (2001). A mite species that consists entirely of haploid females. Science 292:2479-2482.

Weeks AR, Turelli M, Harcombe WR, Reynolds KT & Hoffmann AA (2007). From parasite to mutualist: Rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. PLoS Biol 5:e114.

Weeks AR, Velten R & Stouthamer R (2003). Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. Proc R Soc Lond B 270:1857–1865.

Werren JH (1997a). Biology of *Wolbachia*. Annu Rev Entomol 42:587-609.

Werren JH (1997b). *Wolbachia* and speciation. In Endless forms: species and speciation (ed. Howard D & Berlocher S). Oxford University Press, New York.

Werren JH (1997c). *Wolbachia* run amok. Proc Natl Acad Sci USA 94:11154–11155.

Werren JH & Bartos JD (2001). Recombination in *Wolbachia*. Curr Biol 11:431–435.

Werren JH & Windsor DM (2000). *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? Proc R Soc Lond B 267:1277–1285.

Werren JH, Baldo L & Clark ME (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nat Rev Microbiol 6:741-751.

Werren JH, Hurst GDD, Zhang W, Breeuwer JAJ, Stouthamer R & Majerus MEN (1994). Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). J Bacteriol 176:388–394.

Werren JH, Windsor D & Guo L (1995a). Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proc R Soc Lond B 262:197-204.

Werren JH, Zhang W & Guo LR (1995b). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. Proc Biol Sci 261:55–63.

White MJD (1978). Modes of speciation. W. H. Freeman and Company, San Francisco, CA.

Williamson DL & Poulson DF (1979). Sex ratio organisms (spiroplasmas) of *Drosophila*. In: *The Mycoplasmas III: Plant, Insect Mycoplasmas* (eds Whitcomb RF & Tully JG), pp. 175–208. Academic Press, New York.

Yen JH & Barr R (1971). New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. Nature 232:657-658.

Zchori-Fein E, Borad C & Harari AR (2006). Oogenesis in the date stone beetle, *Coccotrypes dactyliperda*, depends on symbiotic bacteria. Physiol Entomol 31:164–169.

Zchori-Fein E, Roush RT & Hunter MS (1992). Male production induced by antibiotic treatment in *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae), an asexual species. Cell Mol Life Sci 48:102-105.

Zchori-Fein E, Gottlieb Y, Kelly SE, Brown JK, Wilson JM, Karr TL & Hunter MS (2001). A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. Proc Natl Acad Sci USA 98:12555-12560.

Zeh JA & Zeh DW (2006). Male-killing *Wolbachia* in alive-bearing arthropod: brood abortion as a constraint on the spread of a selfish microbe. J Invert Pathol 92:33–38.

Zeh DW, Zeh JA & Bonilla MM (2005). *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. Heredity 95:41–49.

Zhou W, Rousset F & O'Neill SL (1998). Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. Proc R Soc Lond B 265:509-515

Zouros E, Ball AO, Saavedra C & Freeman KR (1994). Mitochondrial DNA inheritance. Nature 368:818.

Anhang

A RFLP-Daten der Populationen der Art *A. lythri*

Population Altenteil, SH									
Tier	HT	Enzym							
		BamHI	HaeIII			HinfI			
		511	98	407	500	135	783	1020	1206
♀ 476	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 477	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 478	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 479	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 480	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 482	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 483	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 484	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 485	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 486	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 487	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 488	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 489	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 491	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 492	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 493	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 495	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 497	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 499	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 500	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 501	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 502	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 503	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 504	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 505	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 506	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 507	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 508	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 509	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 511	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 512	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 513	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 514	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 515	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 516	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 517	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 518	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 519	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 520	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 522	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 524	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 525	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 526	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 527	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 528	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 529	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 530	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 531	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 533	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 537	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 538	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 539	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 540	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 541	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 542	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 543	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 544	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 545	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 546	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 547	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 549	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 550	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 96	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 97	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 98	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 99	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 100	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 101	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 103	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♂ 104	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0

Population Bad Segeberg, SH									
Tier	HT	BamHI	HaeIII			Schnittstellen HinfI			
		511	98	407	500	135	783	1020	1206
ITZ♀2	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
ITZ♀3	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
ITZ♀4	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
ITZ♀6	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
ITZ♀7	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
ITZ♀9	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
ITZ♀12	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
ITZ♂1	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
ITZ♂2	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
ITZ♂3	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
ITZ♂4	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
Moe♀5	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
Moe♀6	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
Moe♀9	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
Moe♀10	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
Moe♂2	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
Moe♂3	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
Moe♂4	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
Moe♂5	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
Moe♂6	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
Moe♂7	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0

Population Barendorf, NI									
Tier	HT	BamHI	HaeIII			HinfI			
		511	98	407	500	135	783	1020	1206
♀ 346	HT1*	N	N	N	N	1	1	1	1
♀ 347	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 348	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 349	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 350	HT1*	N	N	N	N	1	1	1	1
♀ 351	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 352	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 353	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 354	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 355	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 356	HT1*	N	N	N	N	1	1	1	1
♀ 357	HT1*	N	N	N	N	1	1	1	1
♀ 358	HT1*	N	N	N	N	1	1	1	1
♀ 359	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 360	HT3	N	N	N	N	1	0	0	1
♀ 361	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 362	HT1*	N	N	N	N	1	1	1	1
♀ 363	HT1*	N	N	N	N	1	1	1	1
♀ 364	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 365	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 368	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 370	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 371	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 372	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 373	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 374	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 375	HT1	N	N	N	N	1	1	0	0
♀ 376	HT3	N	N	N	N	1	0	0	1
♀ 377	HT1*	N	N	N	N	1	1	1	1
♂ 76	HT2	N	N	N	N	0	0	1	0
♂ 77	HT2	N	N	N	N	0	0	1	0
♂ 78	HT2	N	N	N	N	0	0	1	0

Population Büchen, SH									
Tier	HT	BamHI	HaeIII			Schnittstellen HinfI			
		511	98	407	500	135	783	1020	1206
BUE ♀2	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
BUE ♀3	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
BUE ♀11	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
BUE ♀14	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
BUE ♀19	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
BUE ♀26	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
BUE ♀27	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
BUE ♂1	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
BUE ♂2	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
BUE ♂3	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
BUE ♂4	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0

Population Bretten, BW									
Tier	**HT**	**BamHI**	**HaeIII**			**HinfI**			
		511	**98**	**407**	**500**	**135**	**783**	**1020**	**1206**
♀258	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀259	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀263	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀268	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀276	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀277	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀278	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀299	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀300	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀303	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀304	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀305	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀306	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀310	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀311	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀312	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀313	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀315	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀316	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂46	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂47	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂48	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂52	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂53	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂55	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂56	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂58	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 301	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 302	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 307	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 308	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 309	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 314	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 318	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀409	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 411	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 412	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 50	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 51	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 57	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 59	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 255	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 264	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 265	BRE2	0	1	0	0	1	0	1	0
♀ 266	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 267	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 292	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 294	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 322	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 323	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 324	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 325	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 326	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 327	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 413	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 414	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 415	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 416	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 417	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 418	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 419	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 420	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 421	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 422	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 423	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 424	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♂ 44	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 65	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 66	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 67	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 68	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 86	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 89	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 90	HT2 *	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 288	BRE1	0	1	0	0	1	0	0	1
♀ 291	BRE1	0	1	0	0	1	0	0	1
♀ 297	BRE2	0	1	0	0	1	0	1	0
♀ 405	BRE2	0	1	0	0	1	0	1	0
♀ 406	BRE1	0	1	0	0				

Population Freiburg, BW									
Tier	**HT**	**BamHI**	**HaeIII**			**HinfI**			
		511	**98**	**407**	**500**	**135**	**783**	**1020**	**1206**
Fr1 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr2 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr3 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr4 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr5 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr6 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr7 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr8 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr9 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr10 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr11 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr12 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr13 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr14 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr15 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr16 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr17 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr18 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr19 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr20 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr21 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr22 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr23 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr24 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr25 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr26 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr27 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr28 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr29 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr30 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr31 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Fr32 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0

Population Hahndorf, NI									
Tier	**HT**	**BamHI**	**HaeIII**			**HinfI**			
		511	98	407	500	135	783	1020	1206
♀ 425	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 426	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 427	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 428	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 429	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 430	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 431	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 432	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 433	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 434	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 435	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 436	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 437	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 438	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 439	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 440	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 441	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 442	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 443	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 444	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 445	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 446	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 447	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 448	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 449	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 450	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 451	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 452	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 453	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 454	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 455	HAH1	0	1	1	0	1	1	1	1
♀ 456	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
♀ 457	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 458	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 459	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 460	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 461	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 462	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 463	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 464	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 465	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 466	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 467	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 468	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1

♀ 469	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 470	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 471	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 472	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 473	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 474	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 475	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 709	HAH2	0	1	0	1	1	1	1	1
♀ 710	HAH3	0	1	0	1	1	1	0	0
♀ 712	HAH3	0	1	0	1	1	1	0	0
♂ 91	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 92	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 93	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 94	HAH4	1	1	1	0	1	0	1	0
♂ 95	HAH4	1	1	1	0	1	0	1	0
♂ 142	HAH4	1	1	1	0	1	0	1	0

Population Ilmenau, TH									
Tier	**HT**	**BamHI**	**HaeIII**			**HinfI**			
		511	**98**	**407**	**500**	**135**	**783**	**1020**	**1206**
IL1 ♀	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
IL2 ♀	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
IL3 ♂	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
IL4 ♂	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
IL5 ♂	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
IL6 ♂	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
IL7 ♀	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
IL8 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
IL9 ♀	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
IL10 ♂	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
IL11 ♂	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0

Population Kollmar, SH									
Tier	**HT**	**BamHI**	**HaeIII**			**HinfI**			
		511	**98**	**407**	**500**	**135**	**783**	**1020**	**1206**
KOL1 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL2 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL3 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL4 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL5 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL6 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL7 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
KOL8 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL9 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL10 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL11 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL12 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL13 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL14 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL15 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
KOL16 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL18 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL19 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL20 ♀	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
KOL21 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
KOL22 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL23 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
KOL24 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL25 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL26 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
KOL27 ♀	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
KOL28 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL29 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL30 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
KOL31 ♂	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
KOL32 ♀	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
KOL33 ♂	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0

Population Pevestorf, NI									
Tier	**HT**	**BamHI**	**HaeIII**			**HinfI**			
		511	**98**	**407**	**500**	**135**	**783**	**1020**	**1206**
♀ 329	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♀ 330	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 331	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 332	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 333	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1

♀ 334	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 335	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 336	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 337	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 338	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 339	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 340	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 341	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 343	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 344	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 378	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 379	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♀ 380	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♀ 381	HT1 *	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 382	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♀ 383	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 386	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 388	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 391	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♀ 401	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 402	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♀ 597	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 598	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♀ 600	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♀ 602	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 604	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 606	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♀ 713	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♀ 714	HT1 *	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 716	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♂ 69	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♂ 70	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♂ 71	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 72	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 73	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♂ 74	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♂ 75	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 79	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♂ 80	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♂ 81	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♂ 82	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♂ 84	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
♂ 111	HT2*	0	1	0	1	1	0	1	0
♂ 143	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1

Population Pratjau, SH									
Tier	**HT**	**BamHI**	**HaeIII**			**HinfI**			
		511	**98**	**407**	**500**	**135**	**783**	**1020**	**1206**
PRA2 ♂	HT2	0	1	0	1	1	0	1	0
PRA3 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
PRA4 ♂	HT2	0	1	0	1	1	0	1	0
PRA5 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
PRA6 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
PRA7 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
PRA8 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
PRA9 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
PRA10 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
PRA12 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
PRA13 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
PRA15 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1

Population Treia, SH									
Tier	**HT**	**BamHI**	**HaeIII**			**HinfI**			
		511	**98**	**407**	**500**	**135**	**783**	**1020**	**1206**
Tr1 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
Tr2 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
Tr3 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr4 ♂	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
Tr5 ♂	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
Tr6 ♀	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
Tr7 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr8 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr9 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr10 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr11 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr12 ♀	TRE1	0	1	0	0	1	1	0	0
Tr13 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr14 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1

Tr15 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr16 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr17 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr18 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr19 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr20 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr21 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr22 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
Tr23 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr24 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr25 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
Tr26 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr28 ♀	HT1*	1	1	1	0	1	1	1	1
Tr29 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr30 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr32 ♀	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
Tr33 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr35 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
Tr36 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0

Population Tümlauer Koog, SH									
Tier	**HT**	**BamHI**	**HaeIII**			**HinfI**			
		511	**98**	**407**	**500**	**135**	**783**	**1020**	**1206**
♀ 633	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 634	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 636	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 637	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 639	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 642	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 652	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 662	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 664	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 665	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 666	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 717	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 718	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 719	HT 1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 720	HT 1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 721	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 722	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 723	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 726	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 727	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 728	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 729	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 730	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 731	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 732	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 733	HT 3	1	1	0	0	1	0	0	1
♀ 734	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 735	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 736	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 741	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 742	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 743	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 744	HT 1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♀ 745	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 746	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 747	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 748	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 749	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 751	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 752	HT 1	1	1	1	0	1	1	0	0
♀ 753	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♀ 754	HT 1*	1	1	1	0	1	1	1	1
♂ 123	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 124	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 125	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 127	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 129	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 130	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 131	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 132	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 133	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 145	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 146	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0
♂ 147	HT 2	0	1	0	1	0	0	1	0

Population Wedel, SH									
		BamHI	HaeIII			HinfI			
Tier	HT	511	98	407	500	135	783	1020	1206
WE1 ♀	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
WE2 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE3 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE4 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE5 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE6 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE7 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE8 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE9 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE10 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE11 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE12 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE13 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE14 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE15 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE16 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE17 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE18 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE19 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE20 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE21 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE22 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE23 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE24 ♂	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
WE25 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE26 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE27 ♀	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
WE28 ♂	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
WE29 ♂	HT2	0	1	0	1	0	0	1	0
WE30 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE31 ♀	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
WE32 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE33 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE34 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE35 ♀	HT3	1	1	0	0	1	0	0	1
WE36 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0
WE37 ♀	HT1	1	1	1	0	1	1	0	0

HT - mtDNA Haplotyp
0 - Enzym-Schnittstelle nicht vorhanden
1 - Enzym-Schnittstelle vorhanden
BamHI - Enzym BamHI
HaeIII - Enzym HaeIII
HinfI - Enzym HinfI
Die Zahlen 511, 98, 407, 500, 135, 783, 1020 und 1206 bezeichnen die Schnittstelle des jeweiligen Enzyms (Basenposition).

B Zucht *A. lythri*, kompletter Datensatz

Muttertier			♀ Nr.	Männchen			Anzahl Eier	Anzahl Larven
Code	**HT**	**Wolb.***		**Code**	**HT**	**Wolb.***		
♀**2**	HT1	wA1	1	96 A	HT2	wA2	47	0
			2	96 B			26	5
			3	96 D			28	8
			4	96 E			60	5
			5	96 F			38	0
			6	96 G			0	0
			7	96 H			59	26
			8	96 I			56	34
♀**14**	HT1	wA1	1	30 A	HT2	wA2	0	0
			2	30 B			0	0
			3	30 C			0	0
			4	30 D			0	0
			5	30 E			0	0
			6	30 F			0	0
			7	30 G			0	0
			8	30 H			0	0
			9	30 I			0	0
			10	30 J			0	0
			11	96 B			76	30
			12	96 C			20	13
			13	96 D			12	4
			14	96 F			178	100
			15	96 G			26	6
			16	96 H			23	6
			17	96 I			59	37
			18	96 J			21	3
			19	30 V			8	6
			20	30 Y			39	35
			21	30 L			33	18
			22	30 O			20	8
♀**19**	HT1	---	1	76 A	HT2	wA2	20	7
			2	76 B			20	6
			3	76 C			4	1
			4	76 D			2	1
			5	76 E			1	0
			6	76 F			0	0
			7	76 G			0	0
			8	76 H			4	0
			9	76 I			9	6
			10	76 J			6	3
♀**25**	HT2	wA2	1	32 A	HT1	---	7	2
			2	30 K	HT2	wA2	0	0
			3	30 L			2	0
			4	30 M			1	0
			5	30 N			0	0
			6	30 O			0	0
			7	30 P			0	0
			8	30 Q			1	0
			9	30 R			22	19
			10	30 S			0	0
			11	30 T			14	13
			12	76 F			1	0
			13	76 H			7	0
			14	85 A	HT2	---	76	31
♀**30**	HT2	wA2	1	25 K	HT2	wA2	35	23
			2	25 L			61	23
			3	25 M			18	8
			4	25 N			62	10
			5	25 O			81	40
			6	25 P			82	67

			7	76 A			83	70
			8	76 B			77	33
			9	76 D			46	16
			10	76 E			60	48
♀**34**	HT1	wA1	1	85 A	HT2	---	0	0
			2	85 B			0	0
			3	85 C			0	0
			4	85 D			0	0
			5	85 E			0	0
			6	85 F			0	0
			7	85 G			0	0
			8	85 H			0	0
			9	85 I			0	0
			10	85 J			0	0
			11	103 A	HT2	wA2	0	0
			12	30 A2			11	4
			13	30 F2			34	18
♀**44**	HT1	wA1	1	76 A	HT2	wA2	49	18
			2	76 B			106	52
			3	76 C			80	35
			4	76 D			146	61
			5	76 E			52	22
			6	76 F			164	83
			7	76 G			71	37
			8	76 H			138	24
			9	76 I			114	73
			10	76 J			198	91
♀**47**	HT1	wA1	1	25 A	HT2	wA2	28	6
			2	25 B			2	1
			3	25 C			0	0
			4	25 D			0	0
			5	25 E			6	3
			6	25 F			0	0
			7	25 G			26	9
			8	25 H			0	0
			9	25 I			0	0
			10	25 J			0	0
			11	25 G			16	1
			12	25 I			56	6
♀**60**	HT1	wA1	1	103 A	HT2	wA2	0	0
♀**68**	HT3	wB	1	30 A2	HT2	wA2	49	17
			2	30 B2			2	0
			3	30 C2			0	0
			4	30 D2			0	0
			5	30 E2			0	0
			6	103 A			86	27
			7	25 A			16	0
			8	25 C			0	0
			9	25 I			0	0
			10	25 G			1	0
			11	32 A	HT1	---	16	5
♀**74**	HT1	wA1	1	25 K	HT2	wA2	41	14
			2	25 N			47	44
			3	25 P			99	55
♀**75**	HT2	wA2	1	85 C	HT2	---	55	47
			2	85 I			66	0
♀**79**	HT1	wA1	1	96 A	HT2	wA2	0	0
			2	96 B			9	0
			3	96 C			37	16
			4	96 D			8	1
			5	96 E			5	3
			6	96 F			49	18
			7	96 G			15	6
			8	96 H			16	11
			9	96 I			15	9

			10	96 J			28	21
			11	32 A	HT1	---	76	26
			12	32 A			43	0
♀**82**			1	85 A	HT2	---	167	39
			2	85 B			16	10
			3	85 C			54	21
			4	85 D			78	25
			5	85 E			0	0
			6	85 F			2	0
			7	85 G			104	47
			8	85 H			0	0
			9	85 I			0	0
			10	85 J			0	0
♀**85**	HT2	---	1	76 K	HT2	wA2	0	0
			2	32 A	HT1	---	29	7
			3	25 A	HT2	wA2	37	22
			4	25 C			96	46
♀**89**	HT1	wA1	1	25 A	HT2	wA2	31	30
			2	25 B			159	91
			3	25 C			84	13
			4	25 D			86	55
			5	25 E			0	0
			6	25 F			0	0
			7	25 G			109	55
			8	25 H			156	105
			9	25 I			127	72
			10	25 J			135	84
♀**91**	HT1*	---	1	30 A	HT2	wA2	55	27
			2	30 B			81	52
			3	30 D			60	26
			4	30 E			54	23
			5	30 F			76	37
			6	30 G			35	19
			7	30 J			55	27
			8	25 C			64	30
			9	25 D			65	63
			10	25 G			63	47
			11	25 H			39	0
			12	25 I			50	26
			13	25 J			62	38
♀**96**	HT2	wA2	1	30 U	HT2	wA2	27	20
			2	30 V			0	0
			3	30 W			20	19
			4	30 X			0	0
			5	30 Y			0	0
			6	30 Z			71	51
♀**100**	HT1	wA1	1	30 A	HT2	wA2	49	46
			2	30 B			60	48
			3	30 C			66	59
			4	30 E			0	0
			5	30 F			0	0
			6	30 G			125	87
			7	30 J			89	67
			8	30 A			49	46
♀**103**	HT2	wA2	1	32 A	HT1	---	7	4

C Rezepte

APS 10% (Ammoniumperoxodisulfat)
0,1g APS gelöst in 1ml H_2O

dNTP-Mix 10mM
aus dATP+dCTP+dGTP+dTTP -> 40mM
Verdünnung auf 10mM mit autoklaviertem Reinstwasser

Fixative I
60% Essigsäure-Ethanol, 3:3:4, Eisessig, absol. Ethanol, Aqua Dest.
Fixative II
absol. Essigsäure-Ethanol, 1:1, Eisessig, Ethanol
Fixative III
Eisessig

Giemsa-Färbelösung
Verdünnung 1:24 in Sørensens Phosphat-Puffer pH 6,8

Ladepuffer für Agarosegele (6X)
0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylen-Cyanol FF
40% (w/v) Sucrose in H_2O

Sørensens Phosphat-Puffer pH 6,8, 1l:
KH_2PO_4 4,54g / 500ml H_2O
Na_2HPO_4 4,74g / 500ml H_2O

10%ige Chelex-Suspension in 1XTE-Puffer für ca 50 Tiere
5g Chelex in 45ml 1XTE (pH 8,0)

Stop-Lösung für Sequenzierungen, pH 9,0
10mM EDTA, pH 7,6
95% (v/v) Formamid Ultrapur
0,1% (w/v) Bromphenolblau

Sequenzierungsgel Länge 66cm/Dicke 0,25mm (6%iges denaturierendes Acrylamidgel)
25g Urea (Harnstoff),
30,5 ml H_2O
7,0 ml 10X TBE
4,8 ml Long Ranger Acrylamid-Lösung
500 µl Dimethylsulfoxid (DMSO)
400 µl APS
40 µl TEMED

TAE-Puffer 1X
40mM Tris-Acetat
1mM EDTA
(pH auf 8,5 einstellen)

TBE-Puffer 1X, pH 8,4
89 mM Tris
89 mM Borsäure
2 mM EDTA

TE-Puffer 1X pH 8,0 für DNA-Extraktion mit Chelex
10mM Tris
0,1mM EDTA
+ HCl für pH8,0; 20 min autoklavieren

Ansatz für Sequenzierungsreaktionen Li-Cor

Thermosequenase	2,0 µl
gereinigtes PCR-Produkt	x µl
Sequenzierungsprimer M13-IR800 (6µM)	2,0 µl
Sequenzierungsprimer M13rev-IR700 (3µM)	2,0 µl
H_2O	ad. 13,0 µl

Ansatz für Sequenzierungsreaktionen ABI

gereinigtes PCR-Produkt	x µl
Big Dye	3,0 µl
2,5x Puffer	5,0 µl
Sequenzierungsprimer M13 [10µM]	2,5 µl
Sequenzierungsprimer M13rev [10µM]	2,5 µl
H_2O	ad. 20,0 µl

D Chemikalien und andere Substanzen

Substanz	Hersteller
AciI	Fermentas, St. Leon-Rot
Agarose (Ultra-Pure)	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS) ≥ 98%, p.a.	Roth, Karlsruhe
BamHI	Fermentas, St. Leon-Rot
Borsäure ≥ 99,8 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chelex® 100 Sodium form 50-100 dry mesh	Sigma-Aldrich, Steinheim
Colchicin	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥ 99,5%	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) ≥ 99%, p.a.	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Roth, Karlsruhe
EDTA 99%, p.a.	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a. 99,8%	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formamid ultrapur	Sigma, Steinheim
Giemsa-Färbelösung	Roth, Karlsruhe
HaeIII	Fermentas, St. Leon-Rot
HCl	Merck, Darmstadt
HinfI	Fermentas, St. Leon-Rot
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) ≥ 99%, p.a.	Roth, Karlsruhe
Long Ranger Acrylamid Lösung 50%	Cambrex, Rockland, USA
MaeI	Fermentas, St. Leon-Rot
Magnesiumchlorid für PCR	Invitrogen, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Citrat	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Qiagen, Hilden
10X Puffer für PCR	Invitrogen, Karlsruhe
Roti®-Histokitt II - Einschlussmittel	Roth, Karlsruhe
Sucrose 99,5%	Sigma, Steinheim
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Thermo-Sequenase	Amersham, Freiburg
Tris Ultra Qualität ≥ 99,9%	Roth, Karlsruhe
Urea (Harnstoff) 99,5%, p.a., Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Xylen Cyanol FF	Sigma, Steinheim

Danksagung

Für die Ermöglichung dieser Arbeit, für gute Ratschläge, konstruktive Kritik, zuverlässige Unterstützung in jeglicher Hinsicht und für eine wirklich spektakuläre Zeit geht mein allergrößtes herzlichstes Dankeschön an allererster Stelle an Susanne Dobler.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich jedoch insbesondere auch Diana Mora aussprechen. Sie war die erste, die sich mit dem System *Altica-Wolbachia* auseinandergesetzt hat; ihre Arbeiten bildeten den Ausgangspunkt für alle weiteren Untersuchungen zu diesem Thema, und die Zusammenarbeit und der Gedankenaustausch ermöglichte wesentliche Ergebnisse und Interpretationen.

An Vera Wagschal geht mein Dank für Rat und Tat im Labor; von ihr habe ich (fast) alles gelernt, was es über Laborarbeit zu wissen gibt, und nebenbei kam auch der Spaß nicht zu kurz. Deshalb an dieser Stelle ein ganz besonders herzliches Dankeschön!

Ich möchte aber auch allen anderen lieben Kolleginnen und Kollegen meinen Dank aussprechen, ohne die die Arbeit in Labor und Büro nicht halb so aufregend gewesen wäre: Christian Baden, Sabine Baumann, Christiane Bramer, Hatice Çapar, Safaa Dalla, Steffi Fandrich, Melanie Göttling, Dörte Heyden, Peter Iglauer, Scott Kelley, Birgit Kleinschmidt, Juliette Kober, Gregor Kölsch, Jan-Jakob Laux, Saskia Lieberei, Michael Mende, Karin Meyer, Julia Offe, Georg Petschenka, Helga Pankoke und Samuel Waldron.

Juliette Kober war treibende Kraft bei der Etablierung der karyologischen Untersuchungen; für die umfangreiche Unterstützung beim Test verschiedener Methoden zur Sichtbarmachung von *Altica*-Chromosomen möchte ich ihr ganz besonders herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt natürlich auch all denjenigen, die mir Käfer zur Verfügung gestellt haben: Susanne Dobler, Frank Fritzlar, Gregor Kölsch - insbesondere für viele *A. lythri* von mehreren Schleswig-Holsteinischen Seen -, Jens Krobbach - für Beifang aus diversen Getreidefeldern -, Ingo Narberhaus - ganz besonderer Dank für *Altica longicollis*! - sowie Eduard Petitpierre, Lilly Strüven und Vera Wagschal. Ganz besonders sei hier Wolfgang Bäse gedankt, welcher mit regelmäßigen Käfersendungen aus Sachsen-Anhalt den Datensatz erweiterte. Für die tatkräftige Unterstützung beim Sammeln für die geographische Analyse der Art *Altica lythri* (nebenbei fielen hierbei natürlich auch Käfer anderer Arten an) geht mein Dank an meine Eltern, an Christian Baden, Jan-Jakob Laux, Juliette Kober (ein besonders großes Dankeschön für Tiere aus Thüringen), Saskia

Lieberei, Georg Petschenka und Kai Schütte. Danke auch an Oliver Hallas und Hilke Schröder und alle beteiligten Studenten für den Versuch, in Pevestorf *Altica quercetorum* zu finden.

Dieter Siede gab Unterstützung bei der Bestimmung einiger Funde, auch hierfür sei herzlich gedankt.

Für die Unterstützung diverser Sammelexkursionen, für Unterkunft und Verpflegung danke ich herzlich Christian Baden, Gerhard Dörfler, Dietmar Keyser, Stefan Köster, Saskia Lieberei sowie an Melanie und Peter Morlock.

Für wertvolle Tips zu potentiellen *Altica*-Fundorten geht mein Dank an Till Tolasch und Alexander Riedel; letzterem gebührt außerdem ein besonderes Dankeschön für die Möglichkeit, die Sammlung im Staatlichen Museum für Naturkunde Karlsruhe zu besichtigen. Großer Dank geht auch an den Verein für naturwissenschaftliche Heimatforschung zu Hamburg e.V.; die Verbreitungskarten für die heimischen Käfer waren eine große Hilfe bei der Suche nach eher "ausgefallenen" *Altica*-Arten!

Außerdem möchte ich nicht unerwähnt lassen: Judith Angelstorf, Svenja Kornelius, Thomas Dejaco, Babette Drescher, Kora Thomsen, Janus Borner, Nina Aschmann, Ilko Richter, Marjan Ahmadi, Katharina Fietz, Safaa Dalla und Jakob Holtz sowie Irina Flat und Philipp Borchert, welche alle einen Beitrag zur Fertigstellung dieser Arbeit geleistet haben. Insbesondere gilt mein Dank auch Lilly Strüven und Franziska Hoffmann, welche sich in ihren jeweiligen Bachelor-Arbeiten mit der Gattung *Altica* und mit *Wolbachia* beschäftigt haben und wertvolle zusätzliche Einblicke in dieses System zutage gefördert haben.

Für die Ermöglichung der photographischen Aufnahmen für die Abbildungen 3, 4 und 5 dieser Arbeit danke ich Kai Schütte.

Ich möchte es aber auch nicht versäumen, all denjenigen im Zoologischen Institut und Museum der Universität Hamburg meinen Dank auszusprechen, denen ich im Laufe der Jahre über den Weg gelaufen bin und bei denen ich mit meinen Anliegen nicht auf taube Ohren stieß.

Dieses Projekt wurde unterstützt durch die Graduiertenförderung der Universität Hamburg - herzlichen Dank hierfür.