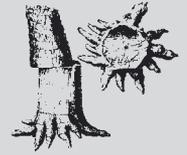


DNA-Barcoding bestätigt „Pheromontypen“ im *Diachrysia chrysitis*-Komplex (Lepidoptera: Noctuidae)



Sven Erlacher, Chemnitz; Michael A. Miller, München
& Axel Hille, Bielefeld

Kurzfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Variation des mtDNA Cytochromoxydase-I-Gens (COI) der Zwillingarten *Diachrysia chrysitis* and *D. tutti* untersucht, deren taxonomischer Status verschiedentlich in Frage gestellt worden ist. Dazu kamen an geografisch weit auseinanderliegenden Standorten Pheromonfallen zur Anwendung, die unterschiedliche Pheromonmischungen enthielten, um männliche Schmetterlinge anzulocken.

DNA-Variationen innerhalb und zwischen *D. chrysitis* und *D. tutti* kann am einfachsten als DNA-Polymorphismus innerhalb eines Komplexes von nah verwandten, und dennoch genetisch wohl zu unterscheidenden „Pheromontypen“ interpretiert werden. DNA-Barcoding (also die Ermittlung sogenannter „Kennsequenzen“) beweist die Existenz signifikanter DNA-Sequenzunterschiede zwischen den untersuchten „Pheromontypen“, unabhängig von ihrer geographischen Herkunft! Die Untersuchungen veranschaulichen die Bedeutung des DNA-Barcoding als Werkzeug zur Klärung taxonomisch schwieriger Fragestellungen.

Abstract

DNA barcoding confirms “pheromotypes” within the *Diachrysia chrysitis*-complex (Lepidoptera: Noctuidae). In this study the variation in the mtDNA cytochrome oxidase subunit I gene (COI) in the noctuid sibling species *Diachrysia chrysitis* and *D. tutti*, whose taxonomic status has been queried, were surveyed. Samples were field-collected from different geographical sites where pheromone traps were baited to attract males containing different mixtures of two blends of pheromone components.

DNA variation within and among *D. chrysitis* and *D. tutti* is most simply interpreted as DNA polymorphism within a complex of closely related, but well differentiated “pheromotypes”. DNA barcoding revealed stable diagnostic differences between pheromotypes irrespective of the geographical origin. The survey illustrated the potential utility of DNA barcoding in assessing lineage structures or taxon limits among moths that have been previously found to be different using the pheromone mate recognition system, but which have not been subjected to DNA analysis.

Einleitung

Die Messingeule, *Diachrysia chrysitis* (LINNAEUS, 1758), ist ein häufiger Nachtfalter aus der artenreichen Familie der Noctuidae, der in den gemäßigten Klimaregionen der Paläarktis weit verbreitet ist. In seiner taxonomische Revision der paläarktischen Goldeulen (Plusiinae) beschreibt KOSTROWICKI (1961) eine Form mit verbundenen Messingbändern auf den Vorderflügeln unter anderem aufgrund diffiziler Genitalunterschiede als eigene Art „*Plusia tutti*“, die heutige *Diachrysia tutti* (KOSTROWICKI 1961). In den folgenden 45 Jahren haben sich zahlreiche Autoren unter Anwendung verschiedener morphologischer Techniken mit der Frage beschäftigt, ob *D. tutti* zweifelsfrei von *D. chrysitis* unterschieden werden kann (JÄRVINEN & VESPÄLÄINEN 1979; REZBYANAI-RESER 1985; BRUUN 1987; LEMPKER 1965, 1966; URBACH 1966, 1967). Der Nachweis

Anschriften der Autoren

Dipl.-Biol. Sven Erlacher, Museum für Naturkunde, Moritzstr. 20, D-09111 Chemnitz; E-Mail: erlacher@naturkunde-chemnitz.de
Dipl.-Biol. Michael A. Miller, c/o Zoologische Staatssammlung München, Münchhausenstr. 21, D-81247 München
Dr. Axel Hille, Rosengarten 21, D-33205 Bielefeld

zweier biologischer Arten im Sinne reproduktiver Isolation erfolgte erstmals durch SVENSSON et al. (1989) aufgrund von Allozymanalysen männlicher Falter aus Pheromonfallen. Messungen der genetischen Divergenz deuteten an, daß es sich bei *D. tutti* durchaus um eine separate Art handeln könnte, die zumindest im schwedischen Untersuchungsgebiet sympatrisch mit *D. chrysitis* vorkommt. Allerdings zeigten die untersuchten Proben große Ähnlichkeit hinsichtlich der festgestellten Allel-Häufigkeiten und ein Fehlen diagnostischer Allele für jedes Taxon, was einen Mangel an voller reproduktiver Isolation nahe legte. Darüber hinaus konnten Unterschiede in der Flugzeit und Habitatpräferenz bei einem Großteil der europäischen Populationen (Schweden, Süddeutschland, Ungarn) beobachtet werden (LÖFSTEDT et al. 1994; REICHHOLF 1985), welche den Schluß zulassen, dass die ökologische Differenzierung und Nischenseparation gegenwärtig noch stattfindet. Eine ausführliche Darstellung einer Reihe von Spezialuntersuchungen, die alle für eine weitgehende, aber nicht ausschließliche Trennung beider „Arten“ sprachen, findet sich bei STEINER (1997).

Im Band 10 der „Noctuidae Europaeae“ wurde *D. tutti* aufgrund von morphologischen Untersuchungen der Genitalorgane mit der ostpaläarktische *Diachrysia stenochrysis* (WARREN 1913) synonymisiert (GOATER et al. 2003). Letztere zeigt gegenüber *D. chrysitis* im ostasiatisch-pazifischen Raum eine „Merkmalsverschiebung“, die eine leichte und sichere genitalmorphologische und auch habituelle Trennung erlaubt. Wir sind dennoch der Auffassung, dass das zugrundeliegende Artkonzept typologisch und eine Synonymisierung nach dem gegenwärtigen Stand des Wissens nicht gerechtfertigt ist, so dass wir es vorziehen, an dem bestehenden Namen (*D. tutti*) festzuhalten.

Sexualpheromone spielen eine wesentliche Rolle bei der Partnerfindung nahezu aller Schmetterlingsarten (ROELOFS et al. 1987; BAKER 2002). Ein allgemeiner Überblick über Insektenpheromone findet sich bei LINN & ROELOFS (1995), eine Liste von Pheromonen hat H. ARN zusammen gestellt: <http://www.nysaes.cornell.edu/pheronet/phlist/diachrysia.html>. Es gilt als sicher, dass Änderungen im System der Pheromonsynthese (ROELOFS et al. 1987; WILLET 2000) und die Fähigkeit von Individuen einer Art, sich darauf einzustellen, am Speziationsprozeß beteiligt sein müssen. Beispielhafte Studien zur Wirkung von Pheromonen wurden von NEWCOMB & GLEESON (1998) und SPERLING & HICKEY (1995) für Tortricidae und von SPERLING et al. (1996) für Noctuidae vorgestellt.



Abb. 1 *Diachrysis* spec. (Form mit verbundenen Messingbändern). Funddaten: Deutschland, Sachsen-Anhalt, Laucha bei Freyburg/Unstrut, 16.VI.1994. Foto: FRANK JULICH, Jena.

Es wurden zahlreiche Felduntersuchungen durchgeführt, die zeigen, dass *D. chrysis* und *D. tutti* über einem sehr großen Teil ihrer geographischen Verbreitung sympatrisch sind (Ungarn: TÓTH & SZÓCS 1988; Schweiz: REZBANYAI-RESER 1985; Süddeutschland: PRIESNER 1985; Norddeutschland, Niedersachsen: ROBENZ 1988; Nordrhein-Westfalen: SCHULZE 1988; Skandinavien: SVENSSON et al. 1989). Auf lokaler Ebene kommen beide Taxa in mehr als 90% der Untersuchungsgebiete gemeinsam vor.

In der vorliegenden Studie berichten wir über die Ergebnisse eines Vergleichs mitochondrialer DNA-Sequenzen (mtDNA) der beiden „Pheromontypen“, *D. chrysis* und *D. tutti* (HILLE et al. 2005). Unsere Analyse unterstreicht die Bedeutung DNA-basierter Identifikation („DNA-Barcoding“) von morphologisch schwer unterscheidbaren Tierarten (z.B. HEBERT et al. 2003a, HEBERT et al. 2003b, HEBERT et al. 2004, HEBERT & GREGORY 2005, KAILA & STÄHLS 2006, MILLER 2007).



Abb. 2 *Diachrysis* spec. (Form mit nicht-verbundenen Messingbändern). Funddaten: Deutschland, Sachsen, Schwarzenberg/Erzgeb., 24.VIII.2005, Foto: STEFFEN THOSS, Auerbach/Vogtland.

Material und Methoden

Methoden zum Fang der Diachrysia-Männchen

Die in dieser Studie untersuchten *Diachrysia*-Exemplare stellten uns E. PRIESNER, C.M. NAUMANN und S. MÜLLER-TAPPE zur Verfügung. Sie wurden mittels zweier verschiedener synthetischer Pheromone entsprechend den bei PRIESNER (1985) beschriebenen Standardmethoden gesammelt. Fangstandorte waren Seewiesen (See) in Bayern sowie Bielefeld (Bi) und Bielefeld-Lämershagen (BiL) in Nordrhein-Westfalen. Die bioaktiven chemischen Pheromonbestandteile wurden durch die Analyse einzelner Drüsenextrakte von präparierten *Diachrysia*-Weibchen unter Verwendung eines Gaschromatogrammen ermittelt. Anschließend konnte die stimulierende Wirkung der synthetisch hergestellten Verbindungen auf *Diachrysia*-Männchen elektroantennographisch bestätigt werden. Die Aufsammlungen bestanden aus zwei Gruppen des *Diachrysia*-Komplexes, die mit Fallen unterschiedlicher bioaktiver Pheromonkomponenten gefangen wurden (*chrysis*- und *tutti*-Typ).

Eine Zusammenstellung der nachgewiesenen und genetisch untersuchten Exemplare findet sich in der webbasierten Datenbank von SYSTAX (Universität Ulm, <http://www.biologie.uni-ulm.de/systax>). Vor der DNA-Analyse wurden alle in den Pheromonfallen gesammelten Exemplare bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 95-100%igem EtOH für wenigstens zwei Wochen aufbewahrt. Die untersuchten Exemplare stammen von zwei geografisch weit (mehr als 600 km Luftlinie!) auseinanderliegenden Lokalitäten: Bielefeld mit den zwei ca. 10 km voneinander entfernten Standorten im Norden und Seewiesen bei Starnberg im Süden Deutschlands. Untersucht wurde ein Minimum von fünf Exemplaren pro Standort, um das Ausmaß der genetischen Divergenz zwischen den geografisch getrennten Populationen zu ermitteln.

DNA Analyse

Zunächst wurden die gesammelten Exemplare entsprechend den zwei verwendeten Fallentypen (*chrysisis*- und *tutti*-Typ) sortiert. Die Extraktion genomischer DNA aus der Thoraxmuskulatur der einzelnen Individuen erfolgte mittels DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers. Die Flügel und Abdomina aller Exemplare wurden in 95-100%igem EtOH überführt und werden zusammen mit der extrahierten DNA an der Zoologischen Staatssammlung München (ZSM) aufbewahrt. In einigen Fällen wurden Dauerpräparate der männlichen Genitalorgane nach den üblichen Standardverfahren angefertigt und ebenfalls an der ZSM hinterlegt (*D. chrysisis*: 426, ZSM N3795, 428, ZSM N3796; *D. tutti*: 247, ZSM N3797, 249, ZSM N3798). Diese und alle weiteren Exemplare versuchte L. RESER (CH-Luzern) mit Hilfe der Genitalpräparation zu bestimmen.

Das mitochondriale Cytochrom-Oxydase-I-Gen (COI) wurde ausgewählt, weil es geeignet ist, genetische Diversität von Artengruppen- bis hin zu Populationen bei verschiedenen Insektentaxa aufzulösen (siehe z.B. CATERINO et al. 2000, 2001, RAND et al. 2000, WAHLBERG & ZIMMERMANN 2000, ARTISS et al. 2001, GOTO & KIMURA 2001, KRUSE & SPERLING 2001, 2002, MONTEIRO & PIERCE 2001). Fünf Exemplare des Pheromontyps „*chrysisis*“ (241, 260, 426, 427, 430) und zwei von „*tutti*“ (249, 425) konnten über die gesamte Länge von 1,5 Kilobasen sequenziert werden. Universalprimer für die PCR-Amplifikation und Sequenzierung wurden SIMON et al. (1994) entnommen. Die genauen Bezeichnungen der Primer sowie weitere technische Details sind in HILLE et al. (2005) beschrieben. Die Sequenzierungen aller Fragmente erfolgte standardmäßig in beide Richtungen. Die Sequenzdaten wurden manuell überprüft und gegen die Noctuiden *Feltia herilis* und *F. jaculifera* (EMBL-Nummern U60991, U60990) unter Verwendung der Softwarepakete BioEdit 5.0.9 (HALL 1999) und ClustalX 1.81 (THOMPSON et al. 1997) aligniert. Die so erhaltenen DNA-Sequenzen befinden sich in der Online-Datenbank von EMBL (*D. chrysisis*: AJ420352-366 und AJ420375, *D. tutti*: AJ420367-373). Die Raten der Substitutionen, Transversionen/Transitionen, genetischen Distanzen und die Bootstrapwerte (NEI 1978, 1987) wurden mit MEGA2 (KUMAR et al. 2001) berechnet. Nähere Informationen zur Distanzberechnung sind HILLE et al. (2005) zu entnehmen.

Ergebnisse

Auswertbare Sequenzen mit einer vergleichbaren Länge von 709 Basenpaaren konnten von 23 Exemplaren beider Fallentypen und beider geografisch verschiedener Fallenstandorte erhalten werden. Diese Daten sind in der Online-Datenbank von SYSTAX abrufbar: <http://www.biologie.uni-ulm.de/systax/daten/index.html>.

Mit einem durchschnittlichen Nukleotidanteil von 30,6% A, 43,1% T, 13,7% C und 12,6% G zeigen die sequenzierten Fragmente die typische AT-Anhäufung der mitochondrialen DNA von Insekten, insbesondere des COI-Genes (CLARY & WÖLSTENHOLME 1985). Von den 709 vergleichbaren Nukleotidpositionen sind neun variabel (mit z.T. nur einer Basensubstitution). Phylogenetisch informative Nukleotidaustausche gibt es an den Alignmentspositionen 157 (C vs. T), 169 (T vs. C), 245 (A vs. T), 295 (G vs. A) und 698 (T vs. C). Die Sequenzvariation zwischen den Pheromontypen *D. chrysisis* und *D. tutti* zeigen einen Aminosäureaustausch (Threonin zu Serin an Aminosäureposition 82/236) im Serincodon an Nukleotidposition 245/709. Das Verhältnis Ts:Tv (Transition und Transversion) beträgt durchschnittlich 2,4, und an der ersten Kodonposition 3,8.

Insgesamt wurden von 16 Exemplaren des *chrysisis*- und von 7 des *tutti*-Fallentyps ein COI-Fragment von 709 Basenpaaren sequenziert. Von allen festgestellten Haplotypen sind drei *chrysisis*-Haplotypen (260, 263, 264, alle See) einmalig. Der häufigste Haplotyp (der von *chrysisis*) wurde bei 13 Exemplaren sowohl im Norden (Bi: 254, 257, 428; BiL: 429, 430) als auch im Süden (See: 237, 241, 259, 274, 275, 276, 426, 427) Deutschlands gefunden. Der zweithäufigste Haplotyp ist *tutti*-spezifisch und konnte nur im Süden (See: 247, 424, 267, 269, 271, 425) festgestellt werden (siehe Tab. 1).

Tabelle 1 Variable COI-Sequenzpositionen (Sequenzpositionen vertikal angeordnet) innerhalb *D. chrysitis* und *D. tutti*.

DNATAX-Nr.	Pheromontyp	Morphologische Determination (L. RESER)	Herkunft	Var. Pos. 112223566 564494319 791550868
237	<i>chrysitis</i>	<i>tutti</i>	See	CTCAGTATT
241	<i>chrysitis</i>	<i>tutti</i>	See
254	<i>chrysitis</i>	<i>chrysitis</i>	Bi
257	<i>chrysitis</i>	<i>chrysitis</i>	Bi
259	<i>chrysitis</i>	<i>chrysitis</i>	See
260	<i>chrysitis</i>	<i>chrysitis</i>	SeeC
263	<i>chrysitis</i>	<i>tutti</i>	SeeG..
264	<i>chrysitis</i>	<i>tutti</i>	SeeGG.
274	<i>chrysitis</i>	<i>tutti</i>	See
275	<i>chrysitis</i>	<i>tutti</i>	See
276	<i>chrysitis</i>	<i>tutti</i>	See
426	<i>chrysitis</i>	<i>tutti</i>	See
427	<i>chrysitis</i>	<i>tutti</i>	See
428	<i>chrysitis</i>	<i>tutti</i>	Bi
429	<i>chrysitis</i>	<i>chrysitis</i>	BiL
430	<i>chrysitis</i>	<i>chrysitis</i>	BiL
247	<i>tutti</i>	<i>tutti</i>	See	TCTTA...C
249	<i>tutti</i>	<i>tutti</i>	See	TC.TAG..C
267	<i>tutti</i>	<i>chrysitis</i>	See	TC.TAG..C
269	<i>tutti</i>	<i>chrysitis</i>	See	TC.TAG..C
271	<i>tutti</i>	<i>tutti</i>	See	TC.TAG..C
424	<i>tutti</i>	<i>chrysitis</i>	See	TCTTA...C
425	<i>tutti</i>	<i>chrysitis</i>	See	TC.TAG..C

Der Vergleich der molekularen Daten zeigt einen maximalen Unterschied von zwei Basenpaaren ($2/709 = 0,282\%$ Nukleotiddiversität) innerhalb der zwei Pheromontypen (*chrysitis*: 263, 264, 2 bp Unterschied zu anderen *chrysitis*-Haplotypen; 260, 0,141% Unterschied; *tutti*: 249, 0,282% Unterschied zu den anderen *tutti*-Haplotypen 247, 424). Die Ergebnisse der paarweisen Vergleiche der prozentualen Nukleotidunterschiede (unkorrigierte p-Distanz) zwischen den 23 Individuen der Gattung *Diachrysia* und den zwei verwendeten Außengruppenvertretern (*Feltia*) sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 Nukleotiddistanzen (in %) innerhalb und zwischen den Taxa sowie Standardabweichung (St.Ab.) für alle COI-Sequenzen von *D. chrysitis* und *D. tutti* (Bootstrapreplikationen = 500). Herkunftsabkürzungen bedeuten: See: See-wiesen, Bayern; Bi: Bielefeld und BiL: Bielefeld-Lämershagen in Nordrhein-Westfalen. Punkte in der Spalte „Var. Pos.“ Bedeuten identische Basen wie in erster Zeile.

	Nukleotid p-Distanz ± St.Ab. [Durchschnitt innerhalb Taxa]	Nukleotid p-Distanz ± St.Ab. [Durchschnitt zwischen Taxa]	
		Außengruppe	<i>chrysitis</i>
Außengruppe (n=2)	5,219% ± 0,839%		
<i>chrysitis</i> (n=16)	0,068% ± 0,040%	10,869% ± 1,048%	
<i>tutti</i> (n=7)	0,134% ± 0,095%	10,588% ± 1,061%	0,864% ± 0,315%

Die untersuchten *Diachrysia*-Exemplare teilen sich in zwei „Pheromontypen“ (Gruppen unterschiedlicher Haplotypen) auf. Eine Gruppe entspricht den mit Hilfe der *chrysis*-Pheromonfallen nachgewiesenen Exemplaren (*chrysis*-Pheromontyp) und zeigt einen durchschnittlichen Nukleotidunterschied untereinander von 0,068%. Die andere Gruppe korrespondiert mit den *tutti*-Pheromontyp mit einem durchschnittlichen Nukleotidunterschied von 0,134%. Die mittlere p-Distanz zwischen den Gruppen beträgt 0,864%. Der generierte, auf einfacher p-Distanz basierende Stammbaum veranschaulicht die klare Trennung der beiden Gruppen. Die Exemplare, die demselben Pheromontyp angehören, gruppieren sich („pheromonfallenspezifisch“) zu statistisch gut gestützten mtDNA-Einheiten, unabhängig von ihrer geografischen Herkunft! Im Gegensatz dazu, konnte keine Übereinstimmung der molekularen Haplotypen mit genitalmorphologischen Merkmalen festgestellt werden (Abb. 3).

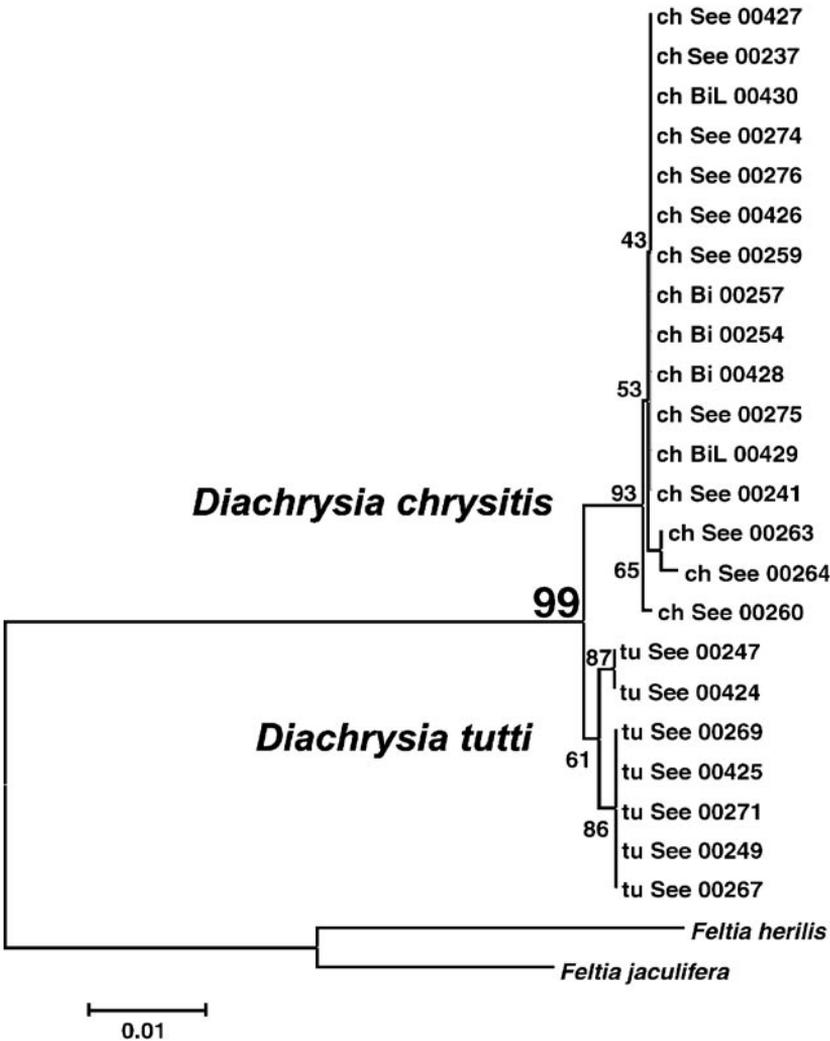


Abb. 3 Genetische Verwandtschaft zwischen COI-Haplotypen von *D. chrysis* und *D. tutti*, mit *Feltia* als Außengruppenvertreter. Dem Dendrogramm liegt eine Neighbour-Joining-Analyse der prozentualen paarweisen Nukleotiddistanzen zugrunde. Zur Ermittlung der Stabilität der Äste wurde das Bootstrap-Verfahren nach NEI & KUMAR (2000) angewandt (Anzahl der Replikationen = 500, Angaben in Prozent).

Diskussion

Zur Klärung der Fragen genetischer Variabilität und Artgrenzen innerhalb von Artkomplexen hat sich die Verwendung mitochondrialer DNA als nützlich erwiesen (z.B. BOGDANOVIC et al. 1993; FREY & FREY 1995; SPERLING & HICKEY 1995; SPERLING et al. 1996, BROWER 1999; LANDRY et al. 1999; KRUSE & SPERLING 2001). HEBERT et al. (2003a) zeigten eindrucksvoll, dass die Analyse relativ kurzer Abschnitte des COI-Gens ein spezifisches Profil ergibt, die sogenannten „Barcodes“, welche eine sichere Zuordnung von Taxa zu „Stämmen“, „Ordnungen“ und Arten ermöglicht. Beispielsweise konnten in einem Modellexperiment mit Hilfe des COI-Barcoding 200 Arten nordamerikanischer Schmetterlinge zu 100% exakt bestimmt werden. Als molekulare Evolutionsrate wird beim COI-Gen von ca. 3% Divergenz pro einer Million Jahre ausgegangen (HEBERT et al. 2003a).

DNA Barcoding, also Messungen der genetischen Distanz, wie beispielsweise eine einfache prozentuale Sequenzdivergenz (Kimura-2-Distanz), sind sehr variabel unter nah verwandten Schmetterlingsarten und demzufolge nicht unbedingt ein guter Maßstab für die Abgrenzung biologischer Spezies (LANDRY et al. 1999; FERGUSON 2002, BURNS et al. 2006). Beispielsweise berichten SPERLING et al. (1995) über nur 1% Sequenzdivergenz unter drei Gespinstmottenarten über eine Gesamtlänge von 2,3 kb des COI/II-Gens. BROWN et al. (1994) hingegen untersuchten eine COI/II-Region von 765 bp bei verschiedenen Populationen von *Greya obscura* (Lep., Prodoxidae) und stellten dabei eine Divergenz von minimal 1% bis maximal 5,7% fest. Die Analyse eines COI-Fragments bei 24 Familien von Schmetterlingen ergab einen Durchschnittswert von 5,4% (HEBERT et al. 2003a). Innerhalb von 42 Arten aus 12 verschiedenen Gattungen von Eulenfaltern (Noctuidae) betrug die durchschnittliche Sequenzdivergenz des untersuchten COI-Fragments 5,8% zwischen den Gattungen und 0,17% zwischen den Arten; die Distanz innerhalb eines 617 bp langen COI-Abschnitts von *D. chrysitis* (260) und *D. aereoides* (AF549732.1 in HEBERT et al. 2003a) beträgt 7,2%, womit in etwa das Niveau der molekularen Differenzierung innerhalb der Gattung *Diachrysia* umrissen ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stützen die Auffassung früherer Autoren von *D. chrysitis* und *D. tutti* als klar unterscheidbare Taxa (PRIESNER 1985; REICHHOLF 1985; SVENSSON et al. 1989; LÖFSTEDT et al. 1994). Während anfänglich noch ausschließlich morphologische Untersuchungen angewendet wurden, um *D. tutti* als eigenes Taxon zu erkennen, führten spätere Pheromon- und Allozymuntersuchungen zu einer Vertiefung des *chrysitis/tutti*-Artenproblems. Die genetische Distanz der beiden Pheromontypen ist mit maximal 0,282% zwar gering (p-Distanz unter 1%), doch entspricht dieser Wert durchaus einem Differenzierungsgrad, welcher oft zwischen Subspezies bzw. geografisch isolierten Populationen oder Arten *in statu nascenti* festgestellt wird.

Bereits nach KOSTROWICKI (1961) handelt es sich bei *D. chrysitis* und *D. tutti* nicht um Formen ein und derselben Art, sondern um morphologisch sehr ähnliche Schwesternarten. Bemerkenswert ist, dass die Morphologie der männlichen Genitalorgane nicht das festgestellte Muster der molekularen Divergenz widerspiegelt, dass also die Evolution der Genitalien offenbar unabhängig vom bisherigen Artbildungsprozess abgelaufen ist. Allerdings ist das Wissen über die Details möglicher Isolationsmechanismen und des Paarungsverhaltens ziemlich gering. Offenbar handelt es sich um einen Fall von sympatrischer Artbildung, bei denen das chemische Kommunikationssystem eine entscheidende Rolle spielt. LÖFSTEDT et al. (1994) berichteten, dass trotz der fortgeschrittenen chemischen Differenzierung innerhalb der Gattung *Diachrysia* Fremdpaarungen zwischen *D. chrysitis* und *D. tutti* vorkommen. Trotz dieser Möglichkeiten, die zu einer Verwaschung der genetischen Muster führen können, belegen die vorliegenden Untersuchungen eine signifikante genetische Differenzierung beider Pheromontypen. Teile des mitochondrialen COI-Gens können als diagnostisches Werkzeug verwendet werden, um diese beiden Formen anhand ihres DNA-Barcodes eindeutig zu differenzieren. Dabei konnte festgestellt werden, dass die COI-Sequenzunterschiede des einen Pheromontypes nicht in dem anderen vorhanden sind. Möglicherweise ist das bereits ein Hinweis auf reproduktive Isolation.

Da Insekten unterschiedlicher Orte, Habitate und Zeiten getrennte Cluster bilden könnten, ist es notwendig, Proben über eine größere geografische Zone zu sammeln, bevor taxonomische Schlussfolgerungen gezogen werden können. Es ist bekannt, dass *D. chrysitis* und *D. tutti* über weite Teile ihres Verbreitungsareals sympatrisch vorkommen, aber geringe Unterschiede in der Phänologie und den Habitatpräferenzen aufweisen. Da zuverlässige morphologische Unterschiede bisher nicht entdeckt werden konnten, gehen wir davon aus, dass weitere ökologische Untersuchungen von Populationen des *D. chrysitis*-Komplexes, einschließlich zu Futterpflanzen und Pheromonen, notwendig sind, um einen möglichen Art-Status von *D. chrysitis* und *D. tutti* zu rechtfertigen.

Die Methode des DNA Barcoding, wie sie in der vorliegenden Studie Anwendung fand, unterstützt den Status von zwei

Pheromontypen als erkennbare biologische Taxa. Neutrale molekulare Marker (wie das COI-Gen) sind nützliche Merkmale zur Klärung der phylogenetischen Beziehungen. Doch für das Verständnis der Pheromonevolution wird die Isolation der Gene erforderlich sein, welche zum einen die Pheromonproduktion der Weibchen (siehe z.B. BAKER 2002) und zum anderen das komplementäre Detektionssystem der Männchen bewirken (z.B. LÖFSTEDT 1993). Unterschiede in diesen Genen können für die Speziation verantwortlich sein (LINN & ROELOFS 1995) und außerdem bedeutende Merkmale zum Erkennen derselben liefern.

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen gut mit denen früherer Allozymuntersuchungen überein, und deuten wie diese darauf hin, dass es sich bei *Diachrysis chrysitis* und *D. tutti* um zwei genetisch gut unterscheidbare Arten in *statu nascenti* handelt (siehe auch SVENSSON et al. 1989). So konnten diagnostische mitochondriale COI-Gensequenzen gefunden werden, die diese beiden Gruppen auftrennt und dadurch für zukünftige Analysen der Populationsstruktur geeignet erscheinen. Es ist auch klar, dass diese beiden Taxa aufgrund der geringen mtDNA-Sequenzunterschiede sehr nah miteinander verwandt sein müssen. Wie immer bei einzelnen Merkmalen kann auch ein Abschnitt der mtDNA nicht immer Artgrenzen widerspiegeln. Ursachen dafür können unter anderem zwischenartliche Genintrogressionen oder sehr schnelle Artaufspaltung sein (AVISE 1994). Für zukünftige Untersuchungen des *Diachrysis chrysitis*-Komplexes sollte der Variation der mtDNA oder von Kerngenen im Zusammenhang mit der Evolution des Pheromonsystems besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Dank

Wir danken KONSTANTIN WITT (Jena) für die technische Unterstützung sowie Prof. Dr. JOSEF REICHHOLF (ZSM, München) für hilfreiche Diskussionen. Dr. LAZI RESER (CH-Luzern) danken wir für seinen Versuch, die untersuchten Exemplare mittels Genitalpräparation zu bestimmen. Für die Bereitstellung der fotografischen Abbildungen danken wir den Herren FRANK JULICH (Jena) und STEFFEN THOSS (Auerbach/Vogtland).

Literatur

- ARTISS, T.; SCHULTZ, T.R.; POLHEMUS, D.A. & SIMON, C. (2001) Molecular phylogenetic analysis of the dragonfly genera *Libellula*, *Ladona*, and *Plathemis* (Odonata: Libellulidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase I and 16S rRNA sequence data. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **18**, 3: 348-361.
- AVISE, J.C. (1994): *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York (Chapman & Hall).
- BAKER, T.C. (2002): Mechanism for saltational shifts in pheromone communication systems. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **99**, 21: 13368-13370.
- BOGDANOVIC, S.M.; WALLNER, W.E.; BELL, J.; ODELL, T.M. & HARRISON, R.G. (1993): Asian Gypsy moths (Lepidoptera: Lymantriidae) in North America. Evidence from molecular data. – *Annals of the Entomological Society of America*, **86**, 6: 710-715.
- BROWER, A.W. (1999): Delimitation of phylogenetic species with DNA sequences: a critique of Davis and Nixon's Population Aggregation Analysis. – *Evolution*, **48**: 199-213.
- BROWN, J.M.; PELLMYR, O.; THOMPSON, J.M. & HARRISON, R.G. (1994): Phylogeny of *Greya* (Lepidoptera: Prodoxidae), based on nucleotide sequence variation in mitochondrial cytochrome oxidase I and II: congruence with morphological data. – *Molecular Biology and Evolution*, **11**: 128-141.
- BRUUN, H. (1987): Longitudinal ridge density of hind-wing scales of *Diachrysis chrysitis* (L.) and *D. tutti* (Kostr.) captured with pheromones (Lepidoptera: Noctuidae). – *Notulae Entomologicae*, **67**: 125-127.
- BURNS, J.M.; JANZEN, D.H.; HAJIBABAEI, M.; HALLWACHS, W. & HEBERT, P.D.N. (2006): DNA barcodes of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of Skipper Butterflies (Hesperiidae) can differ by only one to three nucleotides. – *Journal of the Lepidopterists' Society*, **61**, 3: 138-153.
- CATERINO, M.S.; CHO, S. & SPERLING, F.A.H. (2000): The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. – *Annual Review of Entomology*, **45**: 1-54.
- CATERINO, M.S.; REED, R.D.; KUO, M.M. & SPERLING, F.A.H. (2001): A partitioned likelihood analysis of swallowtail butterfly phylogeny (Lepidoptera: Papilionidae). – *Systematic Biology*, **50**, 1: 106-127.
- CLARY, D.O. & WOLSTENHOLME, D.R. (1985): The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. – *Journal of Molecular Evolution*, **22**: 252-271.

- FERGUSON, J.W.H. (2002): On the use of genetic divergence for identifying species. – *Biological Journal of the Linnean Society*, **75**: 509-516.
- FREY, J.E. & FREY, B. (1995): Molecular identification of six species of scale insects (*Quadraspidiotus* sp.) by RAPD-PCR: Assessing the field-specificity of pheromone traps. – *Molecular Ecology*, **4**: 777-780.
- GOATER, B.; RONKAY, L. & FIBIGER, M. (2003): Catocalinae & Plusiinae. In: HONEY, M. & FIBIGER, M. (Eds.): *Noctuidae Europaeae*, Vol. 10., S. 191-193; Sorø, Denmark (Entomological Press).
- GOTO, S.G. & KIMURA, M.T. (2001): Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear Gpdh genes in *Drosophila*. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **18**, 3: 404-422.
- HALL, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [Computer software and manual]. – *Nucleic Acids Research, Symposium Series*, **41**: 95-98.
- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L. & DEWAARD, J.R. (2003a): Biological identifications through DNA barcodes. – *Proceedings of the Royal Society, Series B, London*, **270**, 1512: 313-321.
- HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S. & DEWAARD, J.R. (2003b): Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. – *Proceedings of the Royal Society, Series B, London*, **270**, suppliment 03BL0066 1-4.
- HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN, D.H. & HALLWACHS, W. (2004): Ten Species in One: DNA Barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerater*. – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 41: 12-17.
- HEBERT, P.D.N. & GREGORY, T.R. (2005): The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. – *Systematic Biology*, **54**, 5: 852-859.
- HILLE, A.; MILLER, M. & ERLACHER, S. (2005): DNA sequence variation at the mitochondrial Cytochrome Oxidase I gene among “pheromotypes” of the sibling taxa *Diachrysis chrysitis* (L.) and *D. tutti* (Kostrowicki, 1961) (Lepidoptera: Noctuidae). – *Zoologica Scripta*, **34**: 49-56.
- JÄRVINEN, O. & VESPÄLÄINEN, K. (1979): Morphological variation in *Diachrysis chrysitis* (Lepidoptera, Noctuidae): a statistical analysis of the wing pattern. – *Notulae Entomologicae*, **59**: 19-26.
- KAILA, L. & STÄHLS, G. (2006): DNA barcodes: evaluating the potential of COI to differentiate closely related species of *Elachista* (Lepidoptera: Gelechioidea: Elachistidae) from Australia. – *Zootaxa*, **1170**: 1-26.
- KOSTROWICKI, A.S. (1961): Studies on the Palaearctic species of the subfamily Plusiinae (Lepidoptera, Phalaenidae). – *Acta Zoologica Cracoviensia*, **6**: 376-472.
- KRUSE, J.J. & SPERLING, F.A.H. (2001): Molecular phylogeny within and between species of the *Archips argyrospila* complex (Lepidoptera: Tortricidae). – *Annals of the Entomological Society of America*, **94**, 2: 166-173.
- KRUSE, J.J. & SPERLING, F.A.H. (2002): Phylogeny of nearctic species of the *xylosteara* group of *Archips* Hübner (Lepidoptera: Tortricidae) based on combined analysis of morphological and mitochondrial DNA data sets. – *Annals of the Entomological Society of America*, **95**, 3: 288-301.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. & NEI, M. (2001): MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 2.1 [Computer Software and Manual]. Pennsylvania and Arizona State Universities, University Park, PA and Tempe, AZ.
- LANDRY, B.; POWELL, J.A. & SPERLING, F.A. (1999): Systematics of the *Argyrotaenia franciscana* (Lepidoptera: Tortricidae) species group: Evidence from mitochondrial DNA. – *Annals of the Entomological Society of America*, **92**, 1: 40-46.
- LEMPKE, B.L. (1965): *Plusia tutti* Kostrowicki and *Plusia chrysitis* L. – *Entomologische Berichten*, **25**: 73-76; Amsterdam.
- LEMPKE, B.L. (1966): *Plusia chrysitis* L. and *Plusia tutti* KOSTROWICKI II (Lepidoptera, Noctuidae). – *Entomologische Berichten*, **26**, 2: 25-26; Amsterdam.
- LINN, C.E. & ROELOFS, W.L. (1995): Pheromone communication in moths and its role in the speciation process. In: LAMBERT, D.M. & SPENCER, H.G. (Eds): *Speciation and the Recognition Process*. S. 263-300; Baltimore, MD. (Johns Hopkins University Press).
- LÖFSTEDT, C. (1993): Moth pheromone genetics and evolution. – *Philosophical Transactions of the Royal Society, London*, **B**, **340**: 167-177.
- LÖFSTEDT, C.; HANSSON, B. S.; TÓTH, M.; SZÖCS, G.; BUDA, V.; BENGTSSON, M.; RYRHOLOM, N.; SVENSSON, M. & PRIESNER, E. (1994): Pheromone differences between sibling taxa *Diachrysis chrysitis* (LINNAEUS, 1758) and *D. tutti* (KOSTROWICKI, 1961) (Lepidoptera: Noctuidae). – *Journal of Chemical Ecology*, **20**, 1: 91-109.
- MILLER, S.E. (2007): DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 12: 4775-4776.
- MONTEIRO, A. & PIERCE, N.E. (2001): Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and EF-1 α Gene Sequences. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **18**, 2: 264-281.
- NEI, M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. – *Genetics*, **83**: 583-590.

- NEI, M. (1987): Molecular Evolutionary Genetics. New York (Columbia University Press).
- NEI, M. & KUMAR, S. (2000): Molecular Evolution and Phylogenetics. New York (Oxford University Press).
- NEWCOMB, R.D. & GLEESON, D.M. (1998): Pheromone evolution within the genera *Ctenopseustis* and *Planotortrix* (Lepidoptera: Tortricidae) inferred from a phylogeny based cytochrome oxidase I gene variation. – *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**: 473-484.
- PRIESNER, E. (1985): Artspezifische Sexuallockstoffe für Männchen von *Diachrysis chrysitis* (L.) und *D. tutti* (Kostr.) (Lepidoptera, Noctuidae: Plusiinae). – *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, **58**: 373-391.
- RAND, D.B.; HEATH, A.; SUDERMANN, T. & PIERCE, N.E. (2000): Phylogeny and life history evolution of the genus *Chryisoritis* within the Aphnaeini (Lepidoptera: Lycaenidae), inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I sequences. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **17**, 1: 85-96.
- REICHHOLF, J.H. (1985): Speciation dynamics in the noctuid moth *Plusia chrysitis* L. (Lepidoptera, Noctuidae). – *Spixiana*, **8**, 1: 75-81.
- REZBANYAI-RESER, L. (1985): *Diachrysis chrysitis* (LINNAEUS, 1758) und *D. tutti* (KOSTROWICKI, 1961) in der Schweiz. – *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, **58**: 345-372.
- ROBENZ, W. (1988): Pheromonfallenfänge von *Diachrysis chrysitis* (L.) und *D. tutti* (KOSTR.) an einem Standort im niedersächsischen Wendland (Lep., Noctuidae). – *Mitteilungen der Arbeitsgemeinschaft Ostwestfälisch-Lippischer Entomologen*, **4**, 43: 120-122.
- ROELOFS, W.; GLOVER, T.; TANG, X.-H.; SRENG, I.; ROBBINS, P.; ECKENRODE, C.; LÖFSTEDT, C.; HANSSON, B. & BENGTESSON, B.O. (1987): Sex pheromone production and perception in European corn borer moths is determined by both autosomal and sex-linked genes. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**: 7585-7589.
- SCHULZE, W. (1988): Bericht über Untersuchungen zum Vorkommen von *Diachrysis chrysitis* (L.) und *D. tutti* (KOSTR.) in Westfalen und Niedersachsen (Lep., Noctuidae, Plusiinae). – *Mitteilungen der Arbeitsgemeinschaft Ostwestfälisch-Lippischer Entomologen*, **4**, 43: 113-120.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H. & FLOOK, P. (1994): Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. – *Annals of the Entomological Society of America*, **87**: 651-702.
- SPELRLING, F.; BYERS, R. & HICKEY, D. (1996): Mitochondrial DNA sequence variation among pheromotypes of the dingy cutworm, *Feltia jaculifera* (Gn.) (Lepidoptera: Noctuidae). – *Canadian Journal of Zoology*, **74**: 2109-2117.
- SPELRLING, F.A.H.; LANDRY, J.F. & HICKEY, D. (1995): DNA-based identification of introduced Ermine moth species in North America (Lepidoptera: Yponomeutidae). – *Annals of the Entomological Society of America*, **88**, 2: 155-162.
- SPELRLING, F. & HICKEY, D. (1995): Amplified mitochondrial DNA as a diagnostic markers for species of conifer-feeding *Choristoneura* (Lepidoptera: Tortricidae). – *The Canadian Entomologist*, **127**, 3: 277-288.
- STEINER, A. (1997): Eulen (Noctuidae), 1. Teil. In: EBERT, G. (Hrsg.): *Die Schmetterlinge Baden-Württembergs*, Band 6, *Nachtfalter IV*, S. 104-105; Stuttgart (Ulmer Verlag).
- SVENSSON, I.; DOUWES, P. & STILLE, B. (1989): Are *Diachrysis chrysitis* (L.) and *D. tutti* (KOSTROWICKI) different species? (Lepidoptera: Noctuidae). – *Entomologica Scandinavica*, **20**: 15-22.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D.G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [Computer software and manual]. – *Nucleic Acids Research*, **24**: 4876-4882.
- TÓTH, M. & SZÓCS, G. (1988): Field tests with sex attractants of *Diachrysis chrysitis* (L.) und *D. tutti* (KOSTR.) (Lepidoptera, Noctuidae) at several sites in Hungary. – *Zeitschrift für Naturforschung*, **43**: 463-466.
- URBAHN, E. (1966): Zur Artenfrage *Plusia chrysitis* L. – *tutti* KOSTROWICKI (Lepidoptera, Noctuidae). – *Reichenbachia*, **6**: 129-136.
- URBAHN, E. (1967): Zur Klärung der *Plusia chrysitis-tutti*-Frage durch Eizuchtuntersuchungen (Lepidoptera, Noctuidae). – *Reichenbachia*, **8**: 133-137.
- WAHLBERG, N. & ZIMMERMANN, M. (2000): Pattern of phylogenetic relationships among members of the tribe Melitaeini (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. – *Cladistics*, **16**: 347-363.
- WILLETT, C.S. (2000): Do pheromone binding proteins converge in amino acid sequence when pheromones converge? – *Journal of Molecular Evolution*, **50**: 175-183.