

5 Sind Sermlylini eine monophyletische Gruppe? Phylogeniehypothese, basierend auf drei kombinierten DNA-Sequenzen

5.1 Zusammenfassung

Die Unterfamilie Galerucinae *s. str.* wird derzeit in fünf Tribus unterteilt, deren phylogenetische Relevanz jedoch nicht geklärt ist. Einige zur Tribus Sermlylini zählende Arten besitzen in ihren Larvalstadien segmentale Wehröffnungen, die als Hinweis auf eine nahe Verwandtschaft verstanden werden könnten. Sie weisen aber anatomische Unterschiede auf, die auch eine konvergente Entstehung dieser Strukturen plausibel erscheinen lassen. Auch die als Schwestergruppe betrachteten Chrysomelinae haben in ihren Larvalstadien Wehrdrüsen, die als Apomorphie dieser systematischen Gruppe angesehen werden.

Um Beiträge zur phylogenetischen Systematik der Galerucinae zu liefern, wurden DNA-Abschnitte aus drei verschiedenen Regionen (*Ef1 α* , 12S rRNA und 16S rRNA) von 29 Galerucinae und 5 Chrysomelinae als Außen-Gruppe sequenziert. Sie wurden sowohl getrennt als auch gekoppelt mit dem Computerprogramm POY ausgewertet, das das Prinzip des optimierten Alignment implementiert ist. Dabei wurden verschiedene Parameter der Analyse wie Kosten für Alignierungslücken und für verschiedene Substitutionstypen variiert.

Die Ergebnisse dieser sequenzbasierten phylogenetischen Analyse lassen vermuten, daß die Tribus Sermlylini kein monophyletisches Taxon ist und daher auch die unterschiedlichen Typen der Wehröffnungen konvergent entstanden sind.

5.2 Einleitung

Das Blattkäfer-Taxon Galerucinae *s. str.* ist mit weltweit über 5800 beschriebenen Arten eine große und taxonomisch schwierige Gruppe. Ansätze zur Erarbeitung einer supragenerischen Klassifizierung der Galerucinae beruhen zumeist auf Adultmerkmalen, wie z.B. die Ausprägung der Coxalhöhlen der vorderen Extremität, der männlichen Genitalien und die Abstände der Antennenbasen zum unteren Augenrand (Laboissière 1934, Wilcox 1965, Wilcox 1971-75). Steinhausen (1998) zieht morphologische Merkmale der Puppen von europäischen Galerucinae zur Gruppeneinteilung heran. Larvalmerkmale sind bisher in geringerem Maße berücksichtigt worden (Crowson & Crowson 1996, Takizawa 1972). Nach einem gebräuchlichen, aber umstrittenen (Crowson & Crowson 1996, pers. Mitteilung C.A.M. Reid) Katalog verschiedener taxonomischer Ebenen der Galerucinae (Seeno & Wilcox 1982) ist diese Unterfamilie in fünf Tribus eingeteilt: Luperini, Galerucini, Metacyclini, Oidini und Sermlylini.

Die Tribus Sermlylini WILCOX 1965, die im Zentrum dieser Arbeit steht, ist die jüngste taxonomische Gruppe und setzt sich aus ca. 400 hauptsächlich asiatischen und afrikanischen Arten

zusammen. Nur zwei Arten sind auch in Europa verbreitet: *Agelastica alni* (L.) und *Sermylassa halensis* (L.). Die Besonderheit einiger Sermlylini-Arten ist die Präsenz von segmental paarweise angeordneten Wehröffnungen in den Larvalstadien, die in der Literatur auch als Wehrdrüsen bezeichnet worden sind (Böving 1929, Laboissière 1934, Paterson 1931, Takizawa 1972). Larvale Wehrdrüsen sind bisher innerhalb der Chrysomelidae nur in der Unterfamilie Chrysomelinae dokumentiert und werden zur Klassifizierung der Arten herangezogen (Pasteels et al. 1984). Sie sind dorsolateral an Thorax- und Abdominalsegmenten lokalisiert und bezüglich Morphologie, Abwehrpotential und chemischer Zusammensetzung der Wehrsekrete gut untersucht (Feld et al. 2001, Pasteels et al. 1988, Termonia & Pasteels 1999).

Auch die Wehröffnungen der Galerucinae-Larven der Tribus Sermlylini sind segmental paarweise am Thorax und Abdomen angeordnet. Die äußerlich ähnlichen Strukturen von Larven verschiedener Galerucinen-Arten sind von Takizawa (1972) anhand von 10 japanischen Arten detailliert in ihrem äußerlichen Erscheinungsbild beschrieben und als systematisches Merkmal zur supragenerischen Gruppenbildung herangezogen worden. Neben der Anordnung und Anzahl der Wehröffnungen wurde hierbei die Ausprägung der larvalen Sklerite berücksichtigt.

Aus einer eigenen morphologischen Untersuchung der larvalen Wehröffnungen der Galerucinae geht hervor, daß die äußerlich relativ gleichförmigen Öffnungen im Integument nicht bei allen untersuchten Vertretern der Sermlylini gleich gestaltet sind (Kap. 2). So gibt es Arten, die Wehröffnungen nur am Abdomen aufweisen. Aus diesen können kutikulare Säckchen ausgestülpt werden, in die jeweils eine exokrine Drüseneinheit inseriert (Typ *A. alni*). Ein zweiter Typ von Wehröffnungen (Typ *S. halensis*) konnte bei einer Reihe von Arten festgestellt werden. Diesen fehlen die ausstülpbaren Säckchen samt exokrinen Drüsen. Sie zeigen lediglich schmale Öffnungen zwischen den Skleriten, die nicht weiter spezialisiert erscheinen.

	<u>Takizawa (1972)</u>	<u>eigene Untersuchung (Kap. 2)</u>
	äußeres Erscheinungsbild	Anatomie
Gruppe 1	11/12 Paare Wehröffnungen	TYP <i>S. halensis</i>
Gruppe 2	12 Paare Wehröffnungen	TYP <i>S. halensis</i>
Gruppe 3	8 Paare Wehröffnungen	TYP <i>A. alni</i>

Außerdem wurden morphologische Unterschiede von an anderen Stellen im Integument verteilten Dermaldrüsenstrukturen zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt. Die morpho-

logischen Befunde allein liefern noch keine hinreichende Begründung für eine Homologisierung der Wehrstrukturen.

Phylogenetische Stammbaumuntersuchungen werden in zunehmendem Maße aus DNA-Sequenzdaten erstellt (Caterino et al. 2000) und zur Polarisierung von morphologischen, ökologischen, verhaltensbiologischen und chemischen Merkmalen hinzugezogen (Clark et al. 2001, Köpf et al. 1998, Meier & Wiegmann 2002, Termonia et al. 2001, Vogler & Kelley 1998, Whiting et al. 2003, Wink & Nickisch-Rosenegk 1997). Hierbei kommen häufig mitochondrielle Sequenzen zum Einsatz, aber auch kernkodierte DNA-Abschnitte von rRNA und Einzelkopie-Genen werden herangezogen.

Ein sehr wichtiger Schritt für die phylogenetische Auswertung ist das Postulat von Positionshomologien, das insbesondere für RNA-kodierende Bereiche Schwierigkeiten bereitet, da diese oft große Variabilität in der Länge der Sequenzen aufweisen. Prinzipiell gibt es drei Möglichkeiten, dieses Problem zu lösen. Einerseits kann man die unsicher zu homologisierenden Bereiche aus der Analyse ausklammern, verliert dabei aber oft wesentliche Teile der potentiellen phylogenetischen Information (Kjer 1995); andererseits wird mit einem Zwischrittverfahren gearbeitet, bei dem zunächst ein Alignment unter Zuhilfenahme eines meist distanzbasierten *guide tree* erstellt wird. Dieses Alignment wird dann unter einem anderen Optimalitätskriterium wie z. B. maximale Parsimonie oder *maximum likelihood* phylogenetisch ausgewertet. Ein dritter Ansatz benutzt die durch die Alignierung der verschieden langen Sequenzen geforderten Lücken als zusätzliche Information für die phylogenetische Rekonstruktion unter einem Optimalitätskriterium (Wheeler 1996); letzterer wurde in dieser Arbeit verfolgt. Die erzeugten molekularen Daten wurden einzeln und simultan nach dem Kriterium der maximalen Parsimonie (größten Sparsamkeit) analysiert. Zur Prüfung der Vertrauenswürdigkeit der Ergebnisse wurde außerdem eine *sensitivity analysis* nach Wheeler (1995) durchgeführt. Dazu wurde die phylogenetische Auswertung der Datensätze nach dem Parsimonie-Kriterium unter 16 verschiedenen Gewichtungskombinationen wiederholt, wobei die angenommenen Kosten von Transversionen relativ zu Transitionen und relativ zu den Kosten für die Insertion von Lücken variiert wurden.

5.3 Material und Methoden

Insekten

In Tab. 5.1 sind die Arten und ihre Funddaten aufgelistet, aus denen selbst Nukleinsäuren extrahiert wurden. Weitere Sequenzen zur späteren Auswertung wurden aus GenBank bezogen.

Tab. 5.1: Funddaten der sequenzierten Blattkäferarten. Ser: Sermlylini; Oid: Oidini; Lup: Luperini; Gal: Galerucini. Bezeichnungen der Tribus nach Seeno & Wilcox (1982). Chry: Chrysomelinae. det: Determination der Arten oder Gattungen durch: RB: Ron Beenen; HT: H. Takizawa; SD: S. Dobler; TW: Th. Wagner; CM C. Maus; CD: C. Duckett; RS: R. Smyth; TM: T. Meiners; JG: J. Gross.

Taxon	Gattung	Art	Funddaten		det
Ser	Agelasa	nigriceps	05/1999, Tomioka, Fukushima Pref.	Japan	HT
Ser	Agelastica	coerulea	05/1999, Fujiwara, Tochigi Pref.	Japan	HT
Ser	Agelastica	alni	05/1999, Krumme Lanke, Berlin	Deutschland	MB
Ser	Arthrotus	niger	05/1999, Tomioka, Fukushima Pref.	Japan	HT
Ser	Arthrotus	abdominalis	09/1998, Fushan	Taiwan	RB
Ser	Dercetina	bretinghami	04/2001, Taman Negara	Malaysia	RB
Ser	Dercetina	flavocincta	09/1998, Fushan	Taiwan	RB
Ser	Dercetina	trifasciata	09/1998, Fushan	Taiwan	RB
Ser	Dercetisoma	concolor	12/1998, Kaosok	Thailand	RB
Ser	Gallerucida	bifasciata	05/1999, Tomioka, Fukushima Pref.	Japan	HT
Ser	Morphosphaera	chrysomeloides	09/1998, Fushan	Taiwan	RB
Ser	Pseudeustetha	hirsuta	12/1998, Kaosok	Thailand	RB
Ser	Sermlyssa	halensis	09/1999, Köppchensee, Berlin	Deutschland	MB
Oid	Oides	epipleuralis	12/1998, Kaosok	Thailand	RB
Oid	Oides	decempunctatus	04/1998, Kenting	Taiwan	RB
Lup	Acalymma	vittatum	09/2001, Ithaca	USA	RS
Lup	Afrocrania	kakameganensis	02/1999, Kakamega Forest, Buyangu	Kenya	TW
Lup	Agetocera	discedens	09/1998, Fushan	Taiwan	RB
Lup	Aulacophora	lewisii	04/2000, „Kofferfund“	Sri Lanka	RB
Lup	Calomicrus	circumfusus	04/1999, Badberg bei Freiburg	Deutschland	CM
Lup	Candezea	haematura	02/1999, Aberdare Mts., Ruhiurini Gate	Kenya	TW
Lup	Cassena	sasaji	09/1998, Fushan	Taiwan	RB
Lup	Diabrotica	balteata	Laborzucht Fa. Novartis, Basel	Schweiz	NV
Lup	Diacantha	sp1	12/1999, ?	Südafrika	RB
Lup	Diacantha	sp2	12/1999, Sirheni	Südafrika	RB
Lup	Diacantha	sp3	02/1999, Kakamega Forest, Buyangu	Kenya	TW
Lup	Diacantha	collaris	12/1999, ?	Südafrika	RB
Lup	Hoplosaenidea	chujoi	09/1998, Fushan	Taiwan	RB
Lup	Monolepta	australis	02/1999, Malanda, New South Wales	Australien	RB
Lup	Monolepta	laeta	02/1999, Mt. Kenya, Nationalpark	Kenya	TW

Taxon	Gattung	Art	Funddaten		det
Lup	Monolepta	nigripes	01/2001, Kuala Tahan	Malaysia	RB
Lup	Paridea	sinensis	09/1998, Fushan	Taiwan	RB
Lup	Phyllobrotica	4maculata	07/1999, Spandauer Forst, Berlin	Deutschland	MB
Lup	Pseudoluperus	lecontii	11/1994, Boulder Canyon, Colorado	USA	SD
Lup	Taphinellina	taiwanum	09/1998, Fushan	Taiwan	RB
Gal	Cerochroa	brachialis	12/1999, ?	Südafrika	CD
Gal	Dircemella	maculicollis	12/1999, ?	Südafrika	RB
Gal	Galeruca	tanaceti	10/1998, Brieselang bei Berlin	Deutschland	TM
Gal	Galeruca	tanaceti	09/1998, Trarego, Piemont	Italien	RB
Gal	Galerucella	lineola	07/1998, Spandauer Forst, Berlin	Deutschland	MB
Gal	Galerucella	nymphaeae	07/1998, Spandauer Forst, Berlin	Deutschland	MB
Gal	Galerucella	nymphaeae	06/1998, Mescherin bei Schwedt	Deutschland	RB
Gal	Lochmaea	capreae	07/2000, Kladska	Tschechien	JG
Gal	Neolochmaea	dilatipennis	12/1998, Maquine	Brasilien	RB
Gal	Pyrrhalta	viburni	08/1999, Grisheim bei Freiburg	Deutschland	CM
Gal	Xanthogaleruca	luteola	05/1999, bei Perpignan	Frankreich	TM
Joker	Galerucine	nicht determiniert	02/1999, ?	Kenya	(TW)
Chry	Chrysolina	polita	07/1999, Spandauer Forst, Berlin	Deutschland	MB
Chry	Gastrophysa	poligoni	06/1997, Tuniberg bei Freiburg	Deutschland	SD
Chry	Gonioctena	5punctata	04/1999, St. Peter bei Freiburg	Deutschland	SD
Chry	Liniaeidea	aenea	07/2000, Kladska	Tschechien	JG
Chry	Phratora	vitellinae	07/2000, Kladska	Tschechien	JG
Chry	Plagioderia	versicolora	07/1996, Untermünstertal bei Freiburg	Deutschland	SD

Nukleinsäure-Extraktion

Abhängig von der Körpergröße der Tiere wurden ganze Imagines, denen zuvor der Darm entfernt worden war, oder nur die Thoraxmuskulatur zur Extraktion der Nukleinsäuren verwendet. Die Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und zermörsert. Die Nukleinsäuren wurden anschließend mit zwei Extraktions-Kits gewonnen [DNeasy™ Tissue Kit, www.qiagen.com) für die DNA-Extraktion und NucleoSpin® RNA-Extraktionskit (Fa. Macherey-Nagel, www.macherey-nagel.com) für die RNA-Extraktion]. Die DNA-Extrakte wurden eingefroren oder direkt für die PCR eingesetzt. Die RNA-Extrakte mußten zuvor in einer reversen Transkription nach Angaben des Herstellers (Superscript™ (Gibco BRL)) in cDNA umgeschrieben werden.

Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction: PCR)

Drei Zielsequenzen wurden amplifiziert: eine ca. 900 bp große Region des Gens für den Elongationsfaktor Efl α (nukleares Einzelkopiegen) und jeweils ca. 500-550 bp große Teilsequenzen der auf der mitochondriellen DNA kodierten großen und der kleinen Untereinheit ribosomaler RNA (16S und 12S rRNA). Die spezifischen Primer sind in Tab. 5.2 aufgeführt. Mit Ausnahme eines Primerpaares für die Zielsequenz im Efl α -Gen waren alle Primer „tailed primers“, d. h. an das 5'-Ende war eine Paß-Sequenz (in Tab. 5.2 rot gekennzeichnet) für die Standardprimer M13 oder M13rev angehängt. Diese Primer kamen dann später in der Sequenzierung zum Einsatz. Der Verlauf des Temperaturprogramms im Thermo-Cycler (Progene, Fa. Techne, Cambridge, UK) sah wie folgt aus: 1x (95 °C 2 min), 35x (95 °C 45 s, X °C 1 min, 72 °C 1 min), 1x (72 °C 5 min); Die Anlagerungstemperatur X betrug für Efl α 45-48 °C, für 12S 55-58 °C und für 16S 45-47 °C. Wenn mit dieser Methode keine PCR-Produkte erhalten werden konnten, wurde die Amplifikation der Efl α - und der 16S-Zielsequenz durch eine während der PCR variierten Anlagerungstemperatur erreicht: 1. *touch-down*-PCR: 1 x (95 °C 2 min); (95 °C 30 s, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min), Absenkung der Temperatur nach je 3 Zyklen um 2 °C (21 Zyklen); 18 x (95 °C 30 s, 44 °C 1 min, 72 °C 1 min); 1 x 72 °C 5 min; Oder 2. Zweischnitt-PCR: 1x (95 °C 3 min, 45 °C 1 min, 72 °C 2 min); 10 x (93 °C 30 s, 42 °C 1 min, 72 °C 2 min), 30x (93 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min); 1x 10 min 72 °C; nach Wink & Nickisch-Rosenegk (1997).

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem NucleoSpinSEQ-Kit (Fa. Macherey-Nagel). In manchen Fällen mußte die Zielsequenz nach der PCR mittels Gelextraktion von unspezifischen Produkten getrennt werden (NucleoSpin Extract 2 in 1, Fa. Macherey-Nagel).

Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden nach der Sanger-Kettenabbruch-Methode mit den in Tab. 5.3 aufgeführten, an einen Fluoreszenzfarbstoff (Absorptionsmaximum 800 nm) gekoppelten Primern sequenziert (Thermosequenase Kits, Fa. Amersham). Die notwendigen DNA-Konzentrationen wurden empirisch ermittelt und hingen von der Intensität der jeweiligen PCR-Bande ab. Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermo-Cycler (Genius, Fa. Techne, Cambridge, UK) nach folgendem Protokoll durchgeführt: 95 °C für 2 min, gefolgt von 30 Zyklen mit 95 °C für 30 s, X °C (Efl α : 54 °C, 12S, 16S: 56 °C) für 15 s, 70 °C für 15 s.

Die Auftrennung der Fragmente durch Gelelektrophorese erfolgte im automatischen Sequenzierer LI-COR 4000L (MWG Biotech, Ebersberg, D), der mit einem Infrarotlaser der

Wellenlänge 800 nm ausgerüstet ist. Die 4%igen Acrylamid-Gele (Long Ranger™, FMC Bioproducts, www.spaspa.it) hatten eine Stärke von 0,25 mm und eine Länge von 66 cm.

Tab. 5.2: Spezifische Primer für die PCR der Zielsequenzen Efl α , 16S rRNA und 12S rRNA. Die Adaptersequenzen für die M13-Sequenzierungsprimer sind kursiv gedruckt.

Eflα	
EFS 149	5'-GA(AG) AA(AG) GC(ACGT) CA(AG) GA(AG) ATG GG-3'
EFA 1106	5'-GTA TAT CCA TTG GAA ATT TGA CC(ACGT) GG(AG) TG(AG)-3'
T-EFS149	5'- <i>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</i> GA(AG) AA(AG) GA(AG) GC(ACGT) CA(AG) GA(AG) ATG GG-3'
T-EFA1106	5'- <i>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</i> GTA TAT CCA TTG GAA ATT TGA CC(ACGT) GG(AG) TG(AG)-3'
T-EF1 α -SN	5'- <i>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</i> TGG GAA AAG G(CT)(CT) CCT TCA AAT ATG C-3'
T-EF1 α -AN	5'- <i>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</i> C(AG)T (AG)AC CAC GAC G(CT)A ATT CTT TGA CAG A-3'
16S	
T-S12883	5'- <i>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</i> CACCGG TTT GAA CTC AGA TC-3'
T-S12887	5'- <i>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</i> CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'
T-A14756	5'- <i>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</i> CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT-3'
12S	
T-S14233	5'- <i>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</i> AAA AGC GAC GGG CGA TGT GT-3'
T-A14756	5'- <i>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</i> GAC AAA ATT CGT GCC AGC AGT-3'

Tab. 5.3: Basenabfolge der verwendeten Sequenzierungsprimer.

EFS 149	5'-GA(AG) AA(AG) GC(ACGT) CA(AG) GA(AG) ATG GG-3'
EFA 1106	5'-GTA TAT CCA TTG GAA ATT TGA CC(ACGT) GG(AG) TG(AG)-3'
M13	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'
M13rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'

Editieren der Sequenzen

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die detektierten Signale den vier Basentypen jeder Sequenzierungsreaktion zugeordnet und die automatische Sequenzleseroutine des Programms BaseImagIR™ (www.licor.com) verwendet. Nach Konvertierung dieser Rohdaten in Standard-Chromatogramme erfolgte die weitere Editierung mit dem Programm Sequencher™ V3.1 (www.genecodes.com).

Alignierung

Die Sequenzen des Abschnitts für den Elongationsfaktor 1 alpha (Efl α) wurden nach Augenschein anhand des Leserasters der kodierten Aminosäuren aligniert. Längenunterschiede am 3'- und am 5'-Ende, die sich durch die Wahl der verwendeten Primer oder durch Mängel bei der optischen Erfassung der sequenzierten Fragmente ergaben, wurden durch Einfügen von „N“ für jeden Basentyp auf 871 Basen ausgeglichen. Ebenso wurde mit einer Alignierungslücke von sechs Basen im Leseraster der Sequenz von *Phyllobrotica quadrimaculata* verfahren. Der solchermaßen alignierte Datensatz wurde in das phylogenetische Programm POY eingegeben. Durch den Befehl „-prealigned“ sollte das Einfügen weiterer Lücken verhindert werden (s. u.). Die RNA-kodierenden Sequenzen wiesen im Gegensatz dazu die für diese DNA-Abschnitte typischen Längenunterschiede auf. Sie wurden ohne vorhergehende Alignierung in POY eingegeben (s. u.).

Phylogenetische Auswertung

Ribosomale Sequenzen von verschiedenen Taxa weisen in der Regel Längenunterschiede auf. Daher ist es schwierig, Positionshomologien der zu ordnenden Sequenzen zu postulieren. Zur Auswertung der Sequenzdaten wurde das Programm POY Ver. 2.99 (Wheeler & Gladstein 2002) benutzt, in das das Verfahren *direct optimization* implementiert ist. Bei dieser Art der phylogenetischen Analyse von Sequenzdaten wird nicht das sonst übliche Zweischnitt-Verfahren unter willkürlicher Annahme von weiteren Parametern, d. h. Kosten für Lückenöffnung und -verlängerung vollzogen. Das Verfahren der direkten Optimierung (Wheeler 1996, Wheeler 2001) bearbeitet die ungeordneten Sequenzen mit heuristischen Methoden, indem ein dynamisches Alignment unter dem Kriterium der maximalen Parsimonie und die Baumbildung unter demselben Kriterium kombiniert wird. Dies bietet den Vorteil, daß das gesamte Verfahren unter einem Optimalitätskriterium vollzogen werden kann und daher logisch konsistent ist (Phillips et al. 2000).

Die als Textdateien editierten Sequenzdaten wurden sowohl separat als auch alle drei Sequenzabschnitte kombiniert als auch nur die beiden RNA-kodierenden Sequenzen analysiert. Da es keine *a priori* Annahmen zur Evolution der Sequenzen gibt, wurde eine Sensitivitätsanalyse (Wheeler 1995) durchgeführt. Dazu wurden die Kosten für das Einsetzen von Alignierungslücken (*gap* 1, 2, 4, 8) und das Verhältnis von Transversionen zu Transitionen ($T_v/T_i = 1:1, 2:1, 5:1, 8:1$, im folgenden auch als *tcr* abgekürzt) verknüpft. Die sich daraus ergebenden 16 Parameterkombinationen wurden für die einzelnen und für die

gekoppelten Datensätze (alle Datensätze, nur RNA-Datensätze) mit folgender Befehlszeile berechnet:

```
poy (-molecularmatrix *.txt) (12S.txt 16S.txt -prealigned EF1a.txt -seed -1
-noleading -oneasis -maxtrees 10 -random 50 -gap (N=1,2,4,8) -drifftbr -
driftspr -slop 5 -checkslop 10 > *.out
```

Die in Klammern angegebenen Befehle wurden für die verschiedenen Rechnungen jeweils variiert. Der Befehl `-molecularmatrix` wurde für drei unterschiedliche Gewichtungen von Transversionen (T_v) zu Transitionen (T_i) in separaten Textdateien definiert.

Topologien, die aus diesen ersten Berechnungen hervorgingen, wurden mit dem Programm Jack2hen (<ftp://ftp.amnh.org/pub/molecular/poy/>) in 1/0-Matrizen (*.tri) umgeschrieben. Diese Matrizen wurden dann zur in POY implementierten Berechnung von Bremer-Werten verwendet. Dieses auch als *branch support*, *decay index* oder Zerfalls-Index bezeichnete Verfahren benutzt ebenfalls das Kriterium maximale Parsimonie. Dabei wird die zusätzlich nötige Schrittzahl ermittelt, um einen Ast/Knotenpunkt zerfallen zu lassen (Bremer 1988).

```
poy (-molecularmatrix *.txt) (12S).txt -noleading (-gap N) -bremer
-constrain (12S.out.tri) > (12S).bre
```

Falls sich nach dieser Berechnung negative Werte für einzelne Knoten des Baumes ergaben, so war dies ein Hinweis darauf, daß in der vorausgehenden Suche nicht der kürzeste Baum gefunden wurde. In diesem Fall wurden die *binary representations* der Ergebnisdatei (*.bin) als Anfangstopologien in eine neue Suche mit erhöhten *slop*-Werten gegeben:

```
poy (-molecularmatrix *.txt) (12S).txt -topofile (12S 1).bin -gap N
-seed -1 -driftspr -drifftbr -oneasis -noleading -maxtrees 10 -random 50
-slop 10 -checkslop 20 > 12S.bre.out
```

Für das neue Ergebnis wurden wiederum Bremer-Werte berechnet und das Verfahren so lange fortgesetzt, bis sich für alle 16 Möglichkeiten positive Bremer-Werte berechnen ließen.

Außerdem wurde der kürzeste komplett aufgelöste Baum (*bush*) für kombiniert und einzeln ausgewertete Datensätze ermittelt:

```
poy -molecularmatrix *.txt 12S.txt 16S.txt -prealigned efla.txt -gap 1
-pairmatrix > alle*.pair
```

Aus dieser Befehlszeile resultierte eine Tabelle paarweiser Distanzen für alle Kombinationen der Taxa. Als minimale Baumlänge für einen unaufgelösten Baum kann der kleinste Wert der Säulensummen als Näherungswert eingesetzt werden (Pers. Mitt. W. Wheeler).

Zur Bewertung der Topologien aus der kombinierten Analyse wurde der *incongruence length difference*-Index (ILD; Mickevich & Farris 1981, Farris et al. 1995) berechnet. In seiner einfachen Form ist dies die Differenz zwischen der Schrittzahl bei kombinierter Auswertung und der Summe der Schrittzahlen der einzeln ausgewerteten Datensätze. Um die Werte aus Analysen mit verschiedenen Parametern zu standardisieren, wurde er nach Wheeler et al. (2001) durch die Schrittzahl der kombinierten Suche dividiert:

$$\text{ILD} = \frac{\text{Schritte}_{\text{KOMBI}} - \text{Summe der Schritte}_{\text{EINZELN}}}{\text{Schritte}_{\text{KOMBI}}}$$

Außerdem wurde eine zweite Standardisierung vorgenommen: Die angenäherte Schrittzahl für einen unaufgelösten Busch wurde für die Berechnung des RILD-Maßes (*rescaled incongruence length difference*; Wheeler & Hayashi 1998) eingesetzt. Dies ist der um die maximale Inkongruenz korrigierte ILD-Wert:

$$\text{RILD} = \frac{\text{Schritte}_{\text{KOMBI}} - \text{Summe der Schritte}_{\text{EINZELN}}}{\text{Max. Schritt}_{\text{KOMBI}} - \text{Schritte}_{\text{KOMBI}}}$$

5.4 Ergebnisse

Von den insgesamt zur Verfügung stehenden 51 Blattkäferarten (davon 46 Galerucinae aus vier Tribus: Galerucini, Luperini, Sermlylini und Oidini) konnten Amplifikate des 12S-rDNA-Abschnitts erhalten werden. Die Amplifikation der Zielsequenz für 16S rDNA und der für den Efl α gelang nicht in allen Fällen, so daß sich ein Schnittmengendatensatz von 34 Arten (29 Galerucinae und 5 Chrysomelinae) für die kombinierte Auswertung der Daten ergab (in Tab. 5.4 grau unterlegte Arten). Der 12S-Datensatz mit 60 Sequenzen wurde außerdem gesondert ausgewertet. Dazu wurden zusätzlich 9 Sequenzen für 12S und 2 für 16S rDNA aus GenBank bezogen (Termonia et al. 2001).

Die Schnittmenge der Arten, für die von jedem Sequenzabschnitt Daten vorlagen, wurde getrennt, alle drei Datensätze kombiniert (alle) und nur die RNA-kodierenden Sequenzen kombiniert (RNA) ausgewertet. Die Schrittzahlen, die sich unter den 16 verschiedenen Parameterkombinationen ergaben, sind in Tab. 5.5 wiedergegeben. Für die EF1 α -Sequenzdaten, die zwar als „-prealigned“ in POY eingegeben wurden, d. h. deren Positionshomologien zuvor anhand des offenen Leserasters festgelegt worden waren, konnten jedoch nur 10 Parameterkombinationen berechnet werden, da auch hier von POY Lücken eingefügt wurden, sobald die Substitutionskosten höher als die Kosten für das Einfügen von Lücken waren. Aus 871

homologen Positionen wurden z. B. bei Lückenkosten von 1 und Substitutionskosten von 5:1 1755 homologe Positionen. Parameterkombinationen, bei denen die Lückenkosten niedriger als die Substitutionskosten waren, wurden daher nicht weiter berücksichtigt. In der Konsequenz konnten sie auch nicht für die kombinierte Auswertung aller drei Datensätze herangezogen werden. Insgesamt gingen aus den 16 Parameterkombinationen in der gekoppelten und separaten Auswertung der drei Sequenzdatensätze 68 Phylogeniehypothesen hervor.

Tab. 5.4: Sequenzierte Arten der Galerucinae und Arten der Chrysomelinae, die zum Außengruppenvergleich herangezogen wurden. x: Sequenz aus eigenem Material erhalten. *: Sequenz aus GenBank. Ser: Sermylini, in Klammern ist die Gruppe nach Takizawa (1972) vermerkt; Oid: Oidini; Lup: Luperini; Gal: Galerucini; Chry: Unterfamilie Chrysomelinae. Die Sequenzen der grau unterlegten Taxa wurden gekoppelt ausgewertet. Die Codes werden in den nachfolgend abgebildeten Cladogrammen verwendet.

Gattung	Art	Taxon	Code	EF1a	12S	16S
				Basen ca. 800	ca. 550	ca. 500
Agelasa	nigriceps	Ser (1)	Agni	x	x	x
Agelastica	coerulea	Ser (3)	Agco	x	x	x
Agelastica	alni	Ser (3)	Agal	x	x	x
Arthrotus	niger	Ser (2)	Arni	x	x	x
Arthrotus	abdominalis	Ser	Arab	x	x	
Dercetina	bretinghami	Ser	Debr	x	x	x
Dercetina	trifasciata	Ser	Detr	x	x	x
Dercetina	flavicinta	Ser	Deva		x	
Dercetisoma	concolor	Ser	Deco	x	x	
Gallerucida	bifasciata	Ser (1)	Gabi	x	x	x
Morphosphaera	chrysomeloides	Ser (3)	Moch		x	
Pseudeustheta	hirsuta	Ser	Pshi	x	x	x
Sermylassa	halensis	Ser (1)	Seha	x	x	x
Oides	decempunctatus	Oid	Oide	x	x	x
Oides	epipleuralis	Oid	Oiep		x	
Acalymma	vittatum	Lup	Acvi	x	x	
Afrocrania	kakameganensis	Lup	Afsp	x	x	x
Agetocera	discedens	Lup	Agdi	x	x	
Aulacophora	lewisii	Lup	Aule	x	x	
Calomicrus	circumfusus	Lup	Caci	x	x	
Candezea	haematura	Lup	Caha	x	x	
Cassena	sasaji	Lup	Casa	x	x	
Diabrotica	balteata	Lup	Diba	x	x	x
Diacantha	sp1	Lup	Chob	x	x	x
Diacantha	sp2	Lup	Dife	x	x	x

Gattung	Art	Taxon	Code	EF1 α	12S	16S
				Basen ca. 800	ca. 550	ca. 500
Diacantha	sp3	Lup	Disp		x	
Diacantha	collaris	Lup	Sost	x	x	x
Hoplosaenidea	chujoi	Lup	Hoch		x	x
Monolepta	australis	Lup	Moau	x	x	x
Monolepta	nigripes	Lup	Moni	x	x	x
Monolepta	laeta	Lup	Moki	x	x	
Phyllobrotica	quadrimaculata	Lup	Phqu	x	x	x
Pseudoluperus	lecontii	Lup	Psle	x	x	x
Paridea	sinensis	Lup	Pasi		x	x
Taphinellina	taiwanum	Lup	Tata		x	x
Cerochroa	brachialis	Gal	Cebr	x	x	x
Dircemella	maculicollis	Gal	Drsp	x	x	x
Galeruca	tanaceti	Gal	Gata	x	x	x
Galeruca	tanaceti	Gal	Gasp	x	x	
Galerucella	lineola	Gal	Gali	x	x	x
Galerucella	nymphaeae	Gal	Gany	x	x	x
Galerucella	nymphaeae	Gal	Gaaq	x	x	x
Lochmaea	capreae	Gal	Loca	x	x	x
Neolochmaea	dilatipennis	Gal	Nedi	x	x	x
Pyrrhalta	viburni	Gal	Pyvi	x	x	x
Xanthogaleruca	luteola	Gal	Xalu	x	x	x
Galerucine	nicht determiniert	?	Gand		x	
Chrysolina	polita	Chry	Cpol	x	x	
Chrysomela	confluens	Chry	Ccon		*	
Chrysomela	cuprea	Chry	Ccup		*	
Chrysomela	tremulae	Chry	Ctre		*	
Gastrophysa	viridula	Chry	Gvir		*	
Gastrophysa	poligoni	Chry	Gpol	x	x	x
Gonioctena	quinquepunctata	Chry	Gqui	x	x	x
Gonioctena	variabilis	Chry	Gvar		*	
Linnaeidea	aenea	Chry	Laen	x	*	*
Phratora	vitellinae	Chry	Pvit	x	x	x
Phaedon	brassicae	Chry	Pbra		*	
Phratora	tibialis	Chry	Ptib		*	
Plagioderia	versicolora	Chry	Pver	x	*	*
Anzahl Arten				45	60	38

Getrennte Auswertung der Sequenzdaten

12S rRNA. Bei alleiniger Auswertung des 12S-Schnittmengendatensatzes mit 34 Taxa werden die Galerucinae nicht monophyletisch dargestellt, die Gattung *Oides* fällt mit Chrysomelinae-Arten zusammen. Die Tribus Galerucini (nach Seeño & Wilcox 1982) dagegen wird in allen Fällen als monophyletische Gruppe wiedergegeben, die Tribus Sermlylini und Luperini jedoch unter keiner der gewählten Bedingungen. Unter zwei Bedingungen werden die Gruppen 1 und 3 nach Takizawa (1972) allerdings nicht als separate Monophyla getrennt, sondern bilden ein Monophylum mit den darunter zusammengefaßten Arten.

16S rRNA. Nach separater Analyse der 16S-rDNA-Sequenzen sind die Galerucinae in den meisten Fällen als Monophylum mit *Oides* dargestellt. Die Tribus Galerucini wird hier in den meisten Fällen als Polyphylum dargestellt, ebenso wie die Sermlylini und Luperini.

Ef1 α . Ähnlich fällt die getrennte Auswertung der Sequenzen für Ef1 α aus: Die Monophylie der Galerucinae wird unterstützt, die Tribus Galerucini, Sermlylini und Luperini erscheinen aber jeweils als Polyphyla. Unter allen Bedingungen werden die Arten von Gruppe 1 und 2 nach Takizawa (1972) als gemeinsame Verwandtschaftsgruppe dargestellt.

Kombinierte Analyse aller drei Zielsequenzen

Die kombinierte Auswertung der drei Datensätze (alle) bringt folgendes Bild: Die Galerucinae bilden hier immer ein Monophylum; auch die Darstellung der Tribus Galerucini als monophyletische Gruppe erweist sich als sehr robust gegenüber den gewählten Auswertungsparametern. Die Sermlylini bzw. die Luperini sind hingegen unter jeder Parameterkombination ein polyphyletisches Taxon. Die Arten der Gruppen 1 und 2 nach Takizawa werden unter 9 von 10 getesteten Bedingungen als geschlossene Verwandtschaftsgruppe dargestellt. Ein Schwestergruppenverhältnis der Gruppe 1 und 3 wird dagegen in weniger als 50 % der erhaltenen Topologien postuliert. In Abb. 5.1 sind alle 19 alternativen Topologien der gekoppelten Auswertung aller drei Zielsequenzen als *majority-rule consensus* dargestellt.

Kombinierte Auswertung der RNA-Datensätze

Bei gekoppelter Analyse der beiden RNA-Datensätze zeigen sich ähnliche Verhältnisse der Gruppen zueinander wie bei der Auswertung aller Sequenzdaten. Der *majority-rule consensus* für alle 17 erhaltenen Topologien der gekoppelten Auswertung der RNA-Sequenzen ist in Abb. 5.2 zu sehen. Die Arten, die der Unterfamilie Galerucinae zugerechnet werden, bilden eine monophyletische Gruppe, mit Ausnahme der Parameterkombinationen gap1, tcr 1:1 und gap 8, tcr 1:1, wo die Gattung *Oides* unter die Chrysomelinae fällt. Die Tribus Galerucini

wird unter 15 der gewählten Auswertungsbedingungen (entspr. 94 % der erhaltenen Topologien) ebenfalls als Monophylum dargestellt, Sermlylini und Luperini hingegen als Polyphylum. Die einzelnen Gruppen nach Takizawa (1972) werden in weniger als 50 % der alternativen Topologien als Schwestergruppen abgebildet. Die Arten aus den Gruppen 1 und 2 sind aber unter einigen der gewählten Bedingungen mit einem gemeinsamem Ursprung dargestellt, die Arten aus den Gruppen 1+3 hingegen nicht.

Gewichtung der Analysen / Sensitivitätsanalyse

Die geringsten Werte für ILD und RILD bei Kombination der drei Datensätze ergeben sich bei einer Gleichgewichtung aller Kosten (gap 1, tcr 1:1) (Tab. 5.5: rote Markierung). Bei alleiniger Berücksichtigung der RNA-Daten wird ein Minimalwert bei Kosten für Alignierungslücken von 2 (gap 2) und einem Gleichverhältnis von Transversionen zu Transitionen (tcr 1:1) erreicht. Die Kombination der RNA-Datensätze resultierte in einer geringeren Inkongruenz als die simultane Auswertung aller drei Datensätze (Tab. 5.5). Das größte Maß an Inkongruenz ergab sich bei Lückenkosten 1 und tcr 8. Die Topologien der beiden Auswertungen mit den geringsten Inkongruenzwerten sind in Abb. 5.3 (alle Datensätze) und Abb. 5.4 (RNA-Datensätze) dargestellt.

Der vollständige 12S Datensatz (60 Taxa) wurde separat für alle 16 Parameterkombinationen berechnet (Tab. 5.6). Bei allen gewählten Lücken- und Substitutionskosten bilden die Galerucinae eine polyphyletische Gruppe, weil die beiden *Oides*-Arten in die Gruppe der Chrysomelinae fallen. Die Galerucini bilden in den meisten Fällen eine monophyletische Gruppe. Nur bei den Kombinationen gap 1, tcr 1:1 und gap 8, tcr 1:1 fallen die Arten *Neolochmaea dilatipennis* und *Cerochroa brachialis* heraus. Die Arten der Sermlylini sowie der Luperini zeichnen sich unter allen Bedingungen als polyphyletische Gruppe ab. Die Gruppen nach Takizawa (1972) werden in den meisten Fällen als separate Verwandtschaftsgruppen dargestellt. Die zweite Gattung aus der Gruppe 3 nach Takizawa (1972), *Morphosphaera*, von der nur die Sequenz für den 12S-rDNA-Abschnitt vorlag, findet sich in einer Gruppe mit den beiden *Agelastica*-Arten. (=Gruppe 3). Die Topologie mit dem Transversions/Transitions-Kostenverhältnis 2 und Lückenkosten 1, die den geringsten RILD-Wert für die Kombination der RNA-Sequenzen hat, ist in Abb. 5.3 dargestellt.

Tab. 5.5: Schrittzahlen der einzeln und kombiniert berechneten Topologien unter verschiedenen Parameterkombinationen (gap: Kosten für Alignierungslücken; tcr: Verhältnis der Kosten für Transversionen zu denen für Transitionen, alle: 12S, 16S und EF1 α kombiniert, RNA: 12S und 16S kombiniert). Minimalwerte für ILD und RILD sind fett markiert.

gap	tcr	12 S	16 S	EF1 α	alle	RNA	ILD alle	RILD alle	ILD RNA	RILD RNA
1	1	1399	1117	1367	4198	2630	0,0750	0,0900	0,0433	0,0543
2	1	1546	1269	1367	4547	2928	0,0802	0,0934	0,0385	0,0463
4	1	1763	1459	1367	5070	3407	0,0948	0,1058	0,0542	0,0613
8	1	2175	1786	1367	5944	4211	0,1036	0,1083	0,0593	0,0618
1	2	1914	1508	-	-	3570	-	-	0,0414	0,0499
2	2	2413	1915	1866	6731	4513	0,0797	0,0964	0,0409	0,0506
4	2	2665	2223	1866	7375	5120	0,0842	0,0974	0,0453	0,0539
8	2	3142	2583	1866	8347	6049	0,0905	0,0993	0,0535	0,0598
1	5	2131	1677	-	-	3975	-	-	0,0420	0,0647
2	5	3902	3098	-	-	7263	-	-	0,0430	0,0680
4	5	5027	3996	3316	13447	9464	0,0823	0,0996	0,0465	0,0591
8	5	5815	4808	3316	15150	11112	0,0799	0,0926	0,0440	0,0529
1	8	2131	1677	-	-	3975	-	-	0,0420	0,0647
2	8	3898	3063	-	-	7283	-	-	0,0442	0,0702
4	8	6520	5081	-	-	12200	-	-	0,0491	0,0587
8	8	8248	6668	4756	21399	15689	0,0807	0,0952	0,0493	0,0608

Auf den nächsten Seiten folgen die Abbildungen 5.1- 5.5.

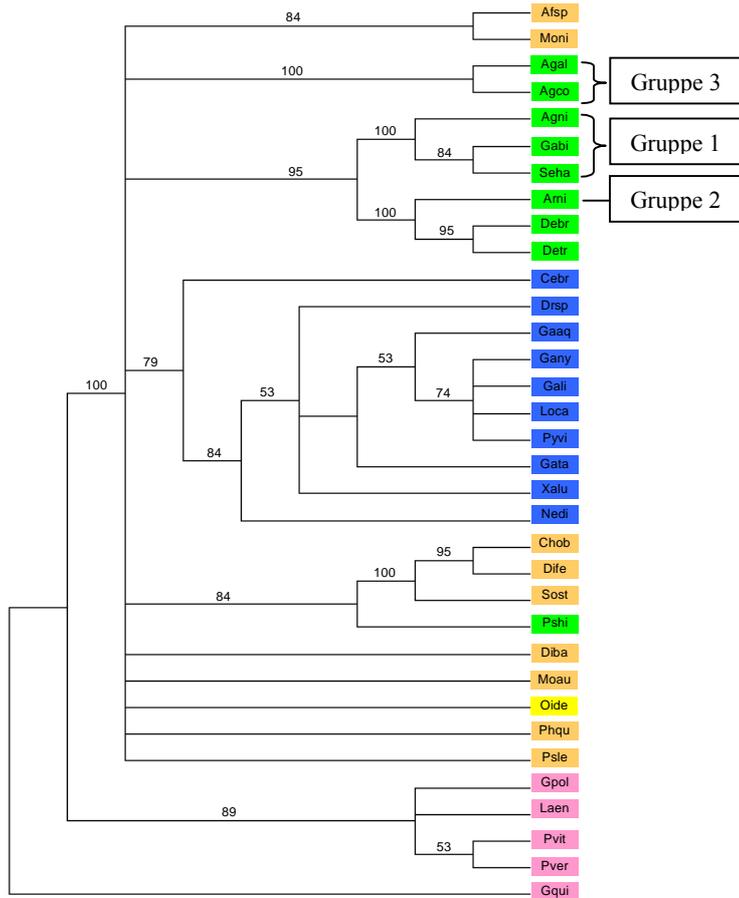


Abb. 5.1: Parameter-Stabilitäts-Baum. Alle Bäume, die bei der gekoppelten Auswertung aller drei Sequenzabschnitte (EF1 α , 12S rRNA und 16S rRNA) erhalten wurden, sind als *majority-rule consensus* dargestellt. Knotenpunkte, die bei mehr als 50 % der verschiedenen Topologien auftauchen, sind mit Zahlen gekennzeichnet. Grün: Sermlyni; braun: Luperini; blau: Galerucini; gelb: Oidini; Rosa: Chrysomelinae; Gruppen 1, 2 und 3 nach Takizawa (1972).

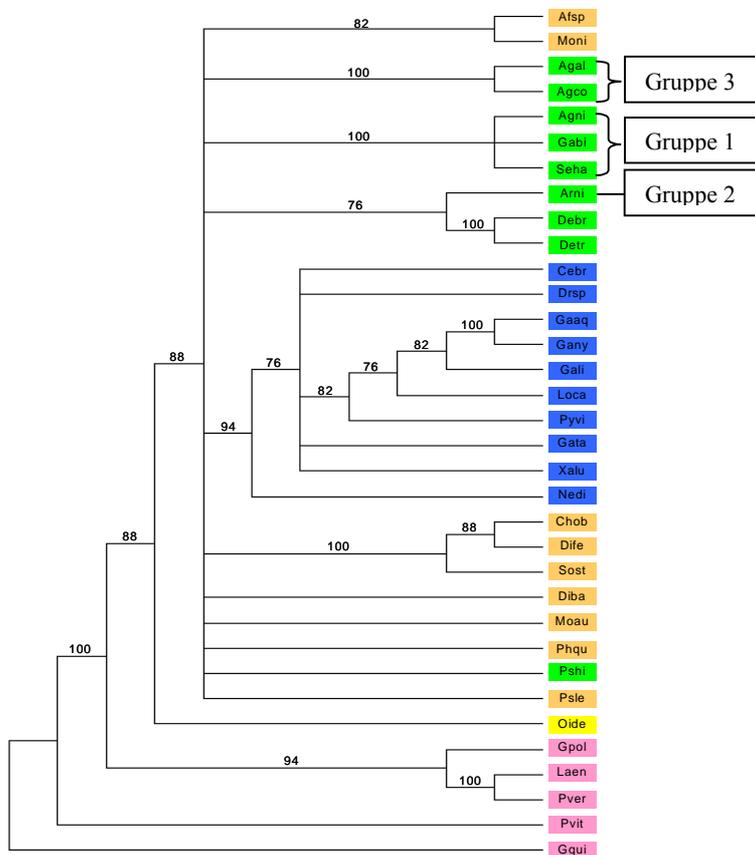


Abb. 5.2: Parameter-Stabilitäts-Baum. Alle Bäume, die bei der gekoppelten Auswertung aller RNA-Sequenzabschnitte (12S rRNA und 16S rRNA) erhalten wurden, sind als *majority-rule consensus* dargestellt. Knotenpunkte, die bei mehr als 50 % der verschiedenen Topologien auftauchen, sind mit Zahlen gekennzeichnet. Grün: Sermlyni; braun: Luperini; blau: Galerucini; gelb: Oidini; Rosa: Chrysomelinae. Gruppen 1, 2 und 3 nach Takizawa (1972).

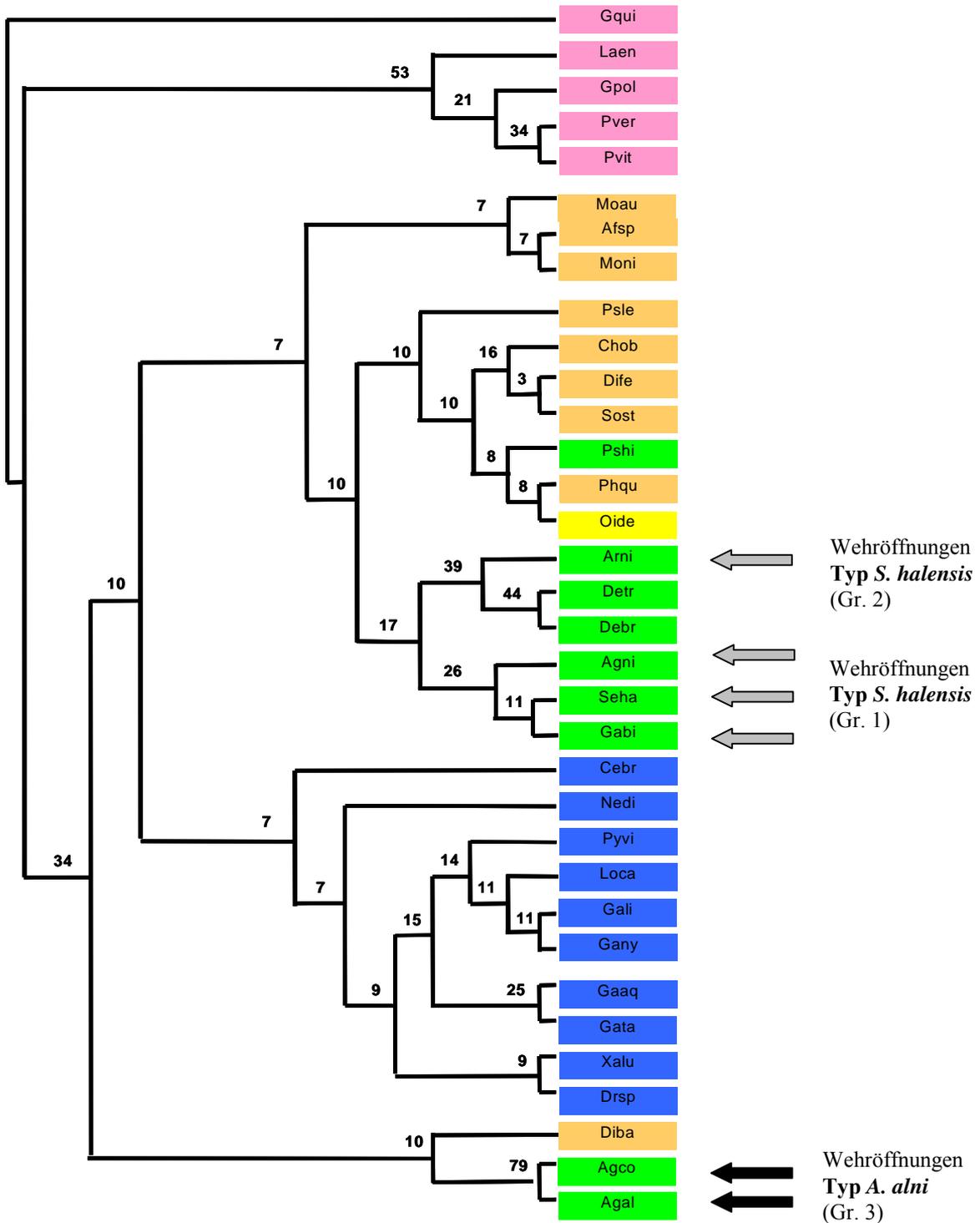


Abb. 5.3: Kombinierte Auswertung der Sequenzen für 12S rRNA, 16S rRNA und Efl α mit dem Programm POY ver 2.99 (Wheeler & Gladstein 2002). Die einzige sparsamste Topologie mit einer Schrittlänge von 4198, für die Lückenkosten und Kosten für das Verhältnis von Transversionen zu Transitionen von 1:1:1 postuliert worden waren, erhielt den minimalen RILD-Wert aller untersuchten 10 Parameterkombinationen. Auf den Ästen sind die Bremer-Werte angegeben; grün: Sermylini; braun: Luperini; blau: Galerucini; gelb: Oidini; rosa: Chrysomelinae. Die Gruppen der Klassifizierung nach Takizawa (1972) sind am Rand in Klammern vermerkt.

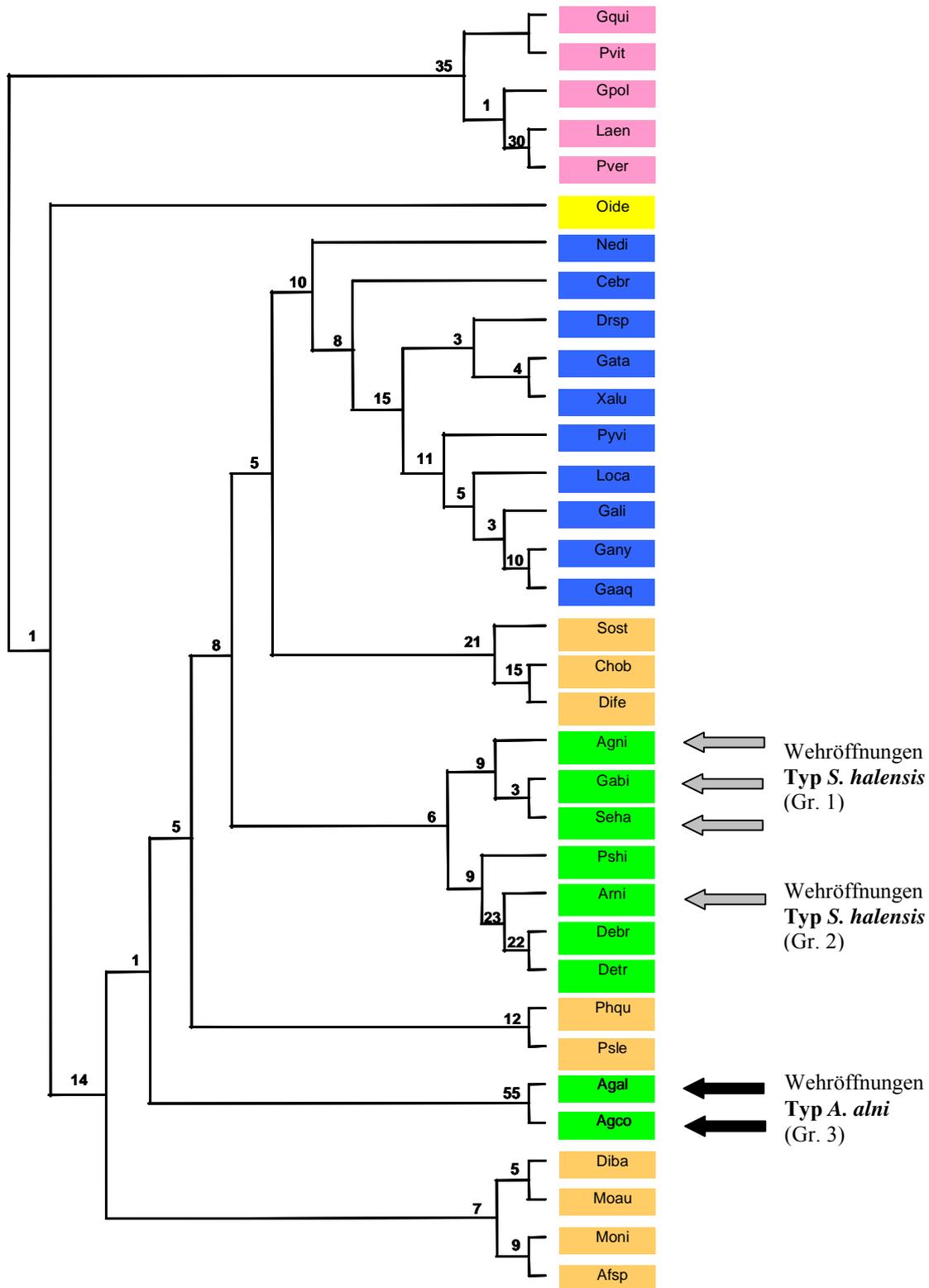


Abb. 5.4: Kombinierte Auswertung der Sequenzen für 12S rRNA und 16S rRNA. Die einzige sparsamste Topologie mit einer Schrittlänge von 2928, für die Lückenkosten und Kosten für das Verhältnis von Transversionen zu Transitionen von 2:1:1 postuliert worden waren, erhielt den minimalen RILD-Wert aller untersuchten 16 Parameterkombinationen. Auf den Ästen sind die Bremer-Werte angegeben; grün: Sermylini; braun: Luperini; blau: Galerucini; gelb: Oidini; rosa: Chrysomelinae. Die Gruppen der Klassifizierung nach Takizawa (1972) sind am Rand in Klammern vermerkt.

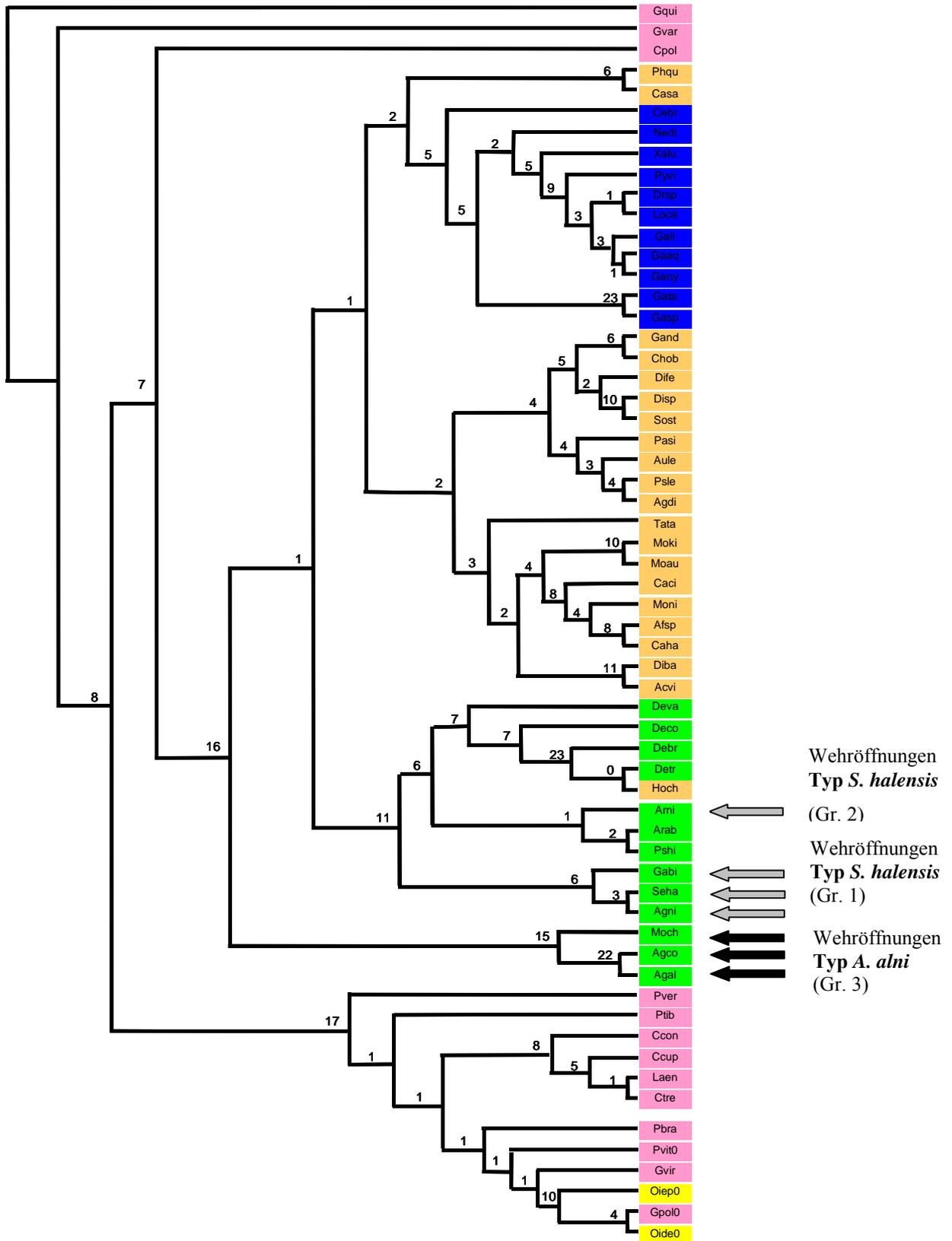


Abb. 5.5: Separate Auswertung der Sequenzen für 12S rRNA (60 Taxa). Die einzige sparsamste Topologie mit einer Schrittlänge von 3097, für die Lückenkosten und Kosten für das Verhältnis von Transversionen zu Transitionen von 2:1:1 postuliert worden waren. Rosa: Chrysomelinae; braun: Luperini; blau: Galerucini; gelb: Oidini; grün: Sermlylini. Die Gruppen der Klassifizierung nach Takizawa (1972) sind am Rand in Klammern vermerkt.

Tab. 5.6: Anzahl der Topologie / Anzahl der Schritte der kürzesten Lösungen nach Auswertung des 12S-rDNA-Datensatzes mit 60 Taxa mit dem Programm POY. gap: Kosten für Alignierungslücken, tcr: Verhältnis der Kosten für Transversionen zu denen für Transitionen.

gap	tcr=1:1	=2:1	=5:1	=8:1
1	1 / 2239	1 / 3097	1 / 3434	1 / 3434
2	2 / 2516	1 / 3843	1 / 6162	1 / 6166
4	3 / 2933	2 / 4405	1 / 8103	1 / 10385
8	1 / 3654	2 / 5244	5 / 9405	1 / 13379

5.5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden für die von verschiedenen Autoren definierten und von Wilcox (1971-75) und Seeno & Wilcox (1982) katalogisierten supragenerischen Gruppen DNA-basierte Stammbaumhypothesen erstellt. Dabei stand die Frage im Vordergrund, welches Verwandtschaftsverhältnis sich für die Sermylini-Arten abzeichnet, deren Larven sog. Wehrdrüsen haben. Diese Arten wurden anhand der Anzahl und Anordnung der larvalen Wehröffnungen und Sklerite in drei Gruppen eingeteilt (Takizawa 1972). Nach einer eigenen morphologischen Untersuchung der Wehröffnungen konnten zwei Typen festgestellt werden (vgl. Kap. 2):

1. Typ *A. alni* mit kutikularen Säckchen und Drüsenzellen daran und
2. Typ *S. halensis* ohne kutikulare Säckchen und Drüsenzellen.

Die Tribus Sermylini WILCOX 1965 ist unter allen hier postulierten Kostenszenarien ein polyphyletisches Taxon. Die einzelnen Gruppen nach Takizawa (1972) stellen sich unter den meisten gewählten Bedingungen als separate Verwandtschaftsgruppen dar. Nur bei separater Auswertung des 12S-rDNA-Datensatzes werden Arten der Gruppe 1 und der Gruppe 2 mit gemeinsamem Ursprung abgebildet, Arten der Gruppe 1 (Wehröffnungen Typ *S. halensis*) und der Gruppe 3 (Wehröffnungen Typ *A. alni*) werden nicht zusammen gruppiert.

Die Kombination von Datensätzen bietet ein höheres Erklärungspotential im Vergleich zu einzeln ausgewerteten Datensätzen (Kluge & Wolf 1993, Nixon & Carpenter 1996). In der simultanen Analyse wird das Parsimonie-Kriterium maximiert, weil Lösungen favorisiert werden, die von allen Daten gleichermaßen unterstützt werden. Dabei können auch sekundäre Signale (*hidden support*) berücksichtigt werden (Nixon & Carpenter 1996, Gatesy et al. 1999). Wenn z. B. aus einem Datensatz zwei alternative Gruppierungen resultieren, weil die Anzahl der Apomorphien gleich ist, können Signale aus einem zweiten Datensatz zur Stützung der einen oder der anderen Alternative führen (Schulmeister et al. 2002). Die

separate Auswertung der in dieser Arbeit eingesetzten Sequenzen, 12S, 16S und *Ef1 α* , ergibt z. B. für die Gattung *Oides* Gruppierungen mit Chrysomelinae (12S), mit verschiedenen Galerucinae (16S) oder nur mit *Diabrotica balteata* (*Ef1 α*). Hier kann es sich um das Phänomen der *random outgroup attraction* (Wheeler 1990) handeln, bei dem das Taxon mit einem anderen Taxon gepaart wird, mit dem es die größte Übereinstimmung aufweist, die aber zufällig ist, weil die Sequenzen so unterschiedlich sind. Die zufällige Übereinstimmung kann bei verschiedenen Parametern der Auswertung variieren. Dies zeigt sich am Beispiel *Oides*, eine Gattung, die in vielen morphologischen Merkmalen als ursprünglich gilt und den Chrysomelinae-Arten ähnlich ist (Crowson & Crowson 1996, Lingafelter & Konstantinov 1999): Bei simultaner Auswertung aller drei Datensätze wird die Gattung meist mit verschiedenen Gattungen der übrigen Galerucinae gruppiert. Nur unter wenigen Bedingungen steht *Oides* als eigener Ast zwischen den Chrysomelinae und den anderen Galerucinae. Nach der Kombination der RNA-Daten fand sich *Oides* unter fast allen Bedingungen als separater Ast zwischen den Chrysomelinae und den übrigen Galerucinae.

Die Tribus Galerucini LABOISSIÈRE 1921 ist die am besten unterstützte Gruppierung. Crowson & Crowson (1996) bezeichnen sie als „largely natural group“, deren Arten viele abgeleitete Merkmale aufweisen. Auch Kim et al. (2003) finden die hier mit Arten aus vier Gattungen repräsentierte Tribus in ihrer kombinierten Auswertung molekularer und morphologischer Daten als Verwandtschaftsgruppe gemeinsamen Ursprungs. Im Hinblick auf gemeinsame Merkmale zur Feindabwehr zeigen alle bisher untersuchten Galerucini-Larven die Präsenz von Anthrachinonen und Anthronen in ihrer Hämolymphe (Hilker et al. 1992).

Die Arten, die der Tribus Luperini LENG 1920 zugerechnet werden, wurden unter keiner der gewählten Parameterkombinationen als monophyletische Gruppe dargestellt. Dieses mit mehr als 3900 beschriebenen Arten größte Taxon der Galerucinae ist nach Seeno & Wilcox (1982) in drei Subtribus unterteilt, wobei unklar bleibt, in welchem Verhältnis diese Untergruppen zueinanderstehen sollen. Die Auswertung des 12S-Datensatzes mit 60 Taxa unterstützt diese drei Subtaxa zum Teil, aber sie gehen bei jeder Kombination der Gewichtungen aus verschiedenen Ästen hervor, sind also getrennte Verwandtschaftsgruppen. Lingafelter und Konstantinov (1999) finden in ihrer Analyse morphologischer Merkmale ebenfalls keine monophyletischen Luperini. Angesichts der großen Artenzahl der Galerucinae liegt hier eine kleine Stichprobe vor, und es konnten nicht alle Tribus gleichermaßen gut repräsentiert werden (Materialbeschaffung und Grenzen bei der PCR). Es fehlen Taxa der Metacyclini und Alticinae. Letztere werden auch als Tribus innerhalb der Galerucinae s. l. (Reid 1995) oder als

Kronengruppe der dann paraphyletischen Galerucinae *s. str.* (Lingafelter & Konstantinov 1999) bewertet. Demgegenüber liefern Kim et al. (2003) nach der kombinierten Auswertung morphologischer Daten und DNA-Sequenzen Argumente für die Monophylie der Galerucinae *s. str.* und unterstützen damit die Hypothese, daß Alticinae eine paraphyletische Gruppe ist (Reid 1995).

Die Ergebnisse der vorliegenden phylogenetischen Untersuchung anhand von molekularen Datensätzen deutet daraufhin, daß die Wehröffnungen der Galerucinae-Larven unabhängig voneinander entstanden sind. Wehröffnungen zur Abgabe von Reflexblut finden sich außer bei den von Takizawa (1972) untersuchten Arten bei Vertretern der Tribus Luperini, *Diabrotica balteata* und *D. undimcempunctata howardi*. Die wurzelminierenden Larven dieser Arten sondern an dorsal zwischen Kopf und Prothorax sowie zwischen den beiden letzten Abdominalsegmenten Hämolymphe ab (Wallace & Blum 1971). Untersuchungen zur Morphologie dieser intersegmentalen Membranen liegen nicht vor.

Sowohl die Einbeziehung morphologischer Daten in eine simultane Analyse mit den vorliegenden Sequenzdaten als auch die Erweiterung der vorliegenden Datensätze zur besseren Taxonrepräsentation kann weitere Beiträge zur Klärung der Galerucinen-Systematik liefern.

5.6 Literatur

Böving, A.G. (1929): Beetle larvae of the subfamily Galerucinae. Proc. U.S. Nat Museum 75: 1-43.

Bremer, K. (1988): The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. Evolution 42: 765-803.

Caterino, M.S., Cho, S. & Sperling, F.A.H. (2000): The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of babel. Annu. Rev. Entomol. 45: 1-54.

Clark, T.L., Meinke, L.J. & Foster, J.E. (2001): Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. Insect Mol. Biol. 10: 303-314.

Crowson, R.A. & Crowson, E.A. (1996): The phylogenetic relations of Galerucinae and Alticinae. In: Chrysomelidae Biology, Vol. 1: The classification. P.H.A. Jolivet & M.L. Cox (Hrsg.). SPB Academic Publishing, Amsterdam: 97-118.

Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult, C. (1995): Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.

Feld, B.K., Pasteels, J.M. & Boland, W. (2001): *Phaedon cochleariae* and *Gastrophysa viridula* (Coleoptera: Chrysomelidae) produce defensive iridoid monoterpenes *de novo* and are able to sequester glycosidically bound terpenoid precursors. *Chemoecology* 11: 191-198.

Gatesy, J., O'Grady, P. & Baker, R.H. (1999): Corroboration among data sets in simultaneous analysis: Hidden support for phylogenetic relationships among higher level artiodactyl taxa. *Cladistics* 15: 271-313.

Hilker, M. (1992): Protective devices of early developmental stages in *Pyrrhalta viburni* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Oecologia* 92: 71-75.

Hilker, M., Eschbach, U. & Dettner, K. (1992): Occurrence of anthraquinones in eggs and larvae of several Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Naturwiss.* 79: 271-274.

Kim, S.J., Kjer, K.M. & Duckett, C.N. (2003): Comparison between molecular and morphological-based phylogenies of galerucine/alticine leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Syst. Evol.* 34: 53-64.

Kjer, K.M. (1995): Use of secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4: 314-330.

Kluge, A.G. & Wolf, A.J. (1993): Cladistics: What's in a word? *Cladistics* 9: 183-199.

Köpf, A., Rank, N.E., Roininen, H., Julkunen-Tiitto, R., Pasteels, J.M. & Tahvanainen, J. (1998): The evolution of host-plant use and sequestration in the leaf beetle genus *Phratora* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Evolution* 52: 517-528.

Laboissière, V. (1934): Galerucinae de la faune française. *Ann. Soc. Entomol. France* 103: 1-108.

Lingafelter, S.W. & Konstantinov A.S. (1999): The monophyly and relative rank of alticine and galerucine leaf beetles: A cladistic analysis using adult morphological characters (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ent. Scand.* 30: 397-416.

Meier, R. & Wiegmann, B.M. (2002): A phylogenetic analysis of Coelopidae (Diptera) based on morphological and DNA sequence data. *Mol. Phyl. Evol.* 25: 393-407.

Mickevich, M.S. & Farris, J.S. (1981): The implications of congruence in *Menidia*. *Syst. Zool.* 27: 143-158.

Nixon, K.C. & Carpenter, J.M. (1996): On simultaneous analysis. *Cladistics* 12: 221-241.

Pasteels, J.M., Rowell-Rahier, M., Braekman, J.-C. & Dalozé, D. (1984): Chemical defense in leaf beetles and their larvae: The ecological, evolutionary and taxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 12: 395-406.

Pasteels, J.M., Braekman, J.-C. & Dalozé, D. (1988): Chemical defense in the Chrysomelidae. In: *Biology of Chrysomelidae*. P. Jolivet, E. Petitpierre & T.H. Hsiao (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 233-252.

Paterson, N.F. (1931): Studies on the Chrysomelidae. Part II. The bionomics and comparative morphology of the early stages of certain Chrysomelidae (Coleoptera, Phytophaga). *Proc. Zool. Soc. London* 3: 879-949.

Phillips, A., Janies, D. & Wheeler, W. (2000): Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis. *Mol. Phylogent. Evol.* 16: 317-300.

Reid, C.A.M. (1995): A cladistic analysis of subfamilial relationships in the Chrysomelidae sensu lato (Chrysomeloidea). In: *Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera*. J. Pakaluk & S.A. Slipinski (Hrsg.). Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa: 559-631.

Schulmeister, S., Wheeler, W.C. & Carpenter, J.C. (2002): Simultaneous analysis of the basal lineages of Hymenoptera (Insecta) using sensitivity analysis. *Cladistics* 18: 455-484.

Seeno, T.N. & Wilcox, J.A. (1982): Leaf beetle genera (Coleoptera: Chrysomelidae). *Entomography* 1: 1-221.

Steinhausen, W.R. (1998): Comparative morphology of pupae of the leaf beetle subfamilies Chrysomelinae and Galerucinae. *Mus. Reg. Sci. Nat. Torino*, 1998: 311-318.

Takizawa, H. (1972): Descriptions of larvae of glanduliferous group of Galerucinae in Japan, with notes on subdivisions of the subfamily (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insecta Matsumurana*, Supplement 10: 1-14.

Termonia, A. & Pasteels, J.M. (1999): Larval chemical defence and evolution of host shifts in *Chrysomela* leaf beetles. *Chemoecology* 9: 13-23.

Termonia, A., Hsiao, T.H., Pasteels, J.M. & Milinkovitch, M.C. (2001): Feeding specialization and host-derived chemical defense in Chrysomeline leaf beetles did not lead into an evolutionary dead end. *PNAS* 98: 3909-3914.

Vogler, A.P. & Kelley, K.C. (1998): Covariation of defensive traits in tiger beetles (genus *Cicindela*): A phylogenetic approach using mtDNA. *Evolution* 52: 529-538.

Wallace, B.S. & Blum, M.S. (1971): Reflex bleeding: A highly refined defensive mechanism in *Diabrotica* larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 64: 1021-1027.

Wheeler, W.C. (1995): Sequence alignment, parameter sensitivity, and the phylogenetic analysis of molecular data. *Syst. Biol.* 44: 321-331.

Wheeler, W.C. (1996): Optimization alignment: The end of multiple sequence alignment in phylogenetics? *Cladistics* 12: 1-9.

Wheeler, W.C. (2001): Homology and the optimization of DNA sequence data. *Cladistics* 17: S3-S11.

Wheeler, W.C. & Hayashi, C.Y.(1998): The phylogeny of extant chelicerate orders. *Cladistics* 14: 173-192.

Wheeler, W.C. & Gladstein, D. (2002): POY: The optimization of alignment characters. American Museum of Natural History. New York. Programm and Dokumentation erhältlich bei <ftp://ftp.amnh.org/pub/molecular/poy/>.

Wheeler, W.C., Whiting, M., Wheeler, Q.D. & Carpenter J.M. (2001): The phylogeny of extant hexapod orders. *Cladistics* 17: 113-169.

Whiting, M.F., Bradler S. & Maxwell, T. (2003): Loss and recovery of wings in stick insects. *Nature* 421: 264-267.

Wilcox, J.A. (1965): A synopsis of the North American Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Bull. N.Y. Stat. Mus. Sci. Serv.* 400: 1-226.

Wilcox, J.A. (1971-1975): Chrysomelidae: Galerucinae. *Coleoptera Catalogus Suppl. pars* 78: 1-770.

Wink, M. & Nickisch-Roseneck, E. von (1997): Sequence data of mitochondrial 16S rRNA of the Arctiidae and Nymphalidae: Evidence for a convergent evolution of pyrrolizidine alkaloid and cardiac glycosid sequestration. *J. Chem. Ecol.* 23: 1549-1568.