



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Wenn Käfer rot sehen:

**Untersuchungen zur Rotsichtigkeit und Bestäubungsbiologie bei
mediterranen Vertretern der Familie Glaphyridae anhand
molekularbiologischer sowie ethologischer Methoden**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Nicole Sommer, Bakk. phil.
Matrikel-Nummer:	9907501
Studienrichtung / Studienzweig (lt. Studienblatt):	Biologie / Zoologie (A 439)
Betreuer:	Privatdoz. Dipl.-Biol. Dr. Johannes Spaethe

Wien, am 08. 11. 2010

Gewidmet

Meiner Familie, die immer an mich geglaubt hat und ohne deren Unterstützung ich es nicht soweit geschafft hätte.

Johannes Spaethe für die Betreuung meiner Diplomarbeit über dieses spannende aber vor allem herausfordernde Thema.

Hannes Paulus für viele fachliche Tipps bezüglich der Freilandexperimente sowie die Beschaffung einiger meiner Versuchstiere.

Dr. Guido Sabetinelli für die unkomplizierte und schnelle Bestimmung der Käfer.

Gerald Timelthaler für unzählige praktische sowie theoretische Tipps und Hilfestellungen während der Durchführung der Laborexperimente sowie für die Erheiterung des teilweise tristen Laboralltags.

Martin Streinzer für seine Hilfe in jeglicher Hinsicht sowie für die Fotos der Käfer.

Linde, Kathi, Kerstin, Sarah, Benjamin und Elisabeth für die große Hilfsbereitschaft und das gute Klima innerhalb der Gruppe.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	5
Zusammenfassung	6
1. Allgemeine Einleitung	8
2. Teil I: Charakterisierung des Langwellen-Opsins und der CO1-Region	10
2.1. Einleitung	10
2.1.1. Das visuelle System der Insekten: Photopigmente und Phototransduktion	10
2.1.2. Spektrale Empfindlichkeiten im Insektenreich	11
2.1.3. Molekulare Daten zur Langwellen-Perzeption bei Käfern	12
2.1.4. Entstehungsmöglichkeiten für Rot-Rezeptoren	12
2.1.5. Fragestellungen	15
2.2. Material & Methoden	15
2.2.1. Opsin-Gen-Sequenzierung	15
2.2.1.1. Versuchszeitraum, Versuchstiere	15
2.2.1.2. RNA-Extraktion	16
2.2.1.3. cDNA-Synthese/Reverse Transkription	17
2.2.1.4. Primer	17
2.2.1.5. PCR, Aufreinigung, Sequenzierung	19
2.2.1.6. Phylogenetische Analyse	20
2.2.2. CO1-Region	21
2.2.2.1. Versuchszeitraum, Versuchstiere	21
2.2.2.2. DNA-Extraktion	22
2.2.2.3. Primer	22
2.2.2.4. PCR, Aufreinigung, Sequenzierung	22
2.2.2.5. Phylogenetische Analyse	23
2.3. Ergebnisse	24
2.3.1. Opsin-Gen-Sequenzierung	24
2.3.1.1. Langwellen-Opsin-Charakterisierung	24
2.3.1.2. Phylogenie der untersuchten Insekten-Opsine	27
2.3.1.3. Spectral Tuning Sites	28
2.3.2. CO1-Region	30
2.4. Diskussion	32
2.4.1. Opsin-Gen-Sequenzierung	32
2.4.1.1. Langwellen-Opsin-Charakterisierung	32
2.4.1.2. Phylogenie der untersuchten Insekten-Opsine	33
2.4.1.3. Spectral Tuning Sites	33
2.4.2. CO1-Region	39
3. Teil II: Blütenpräferenz und Bestäubungsbiologie bei Käfern der Gattung <i>Pygopleurus</i> (Glaphyridae)	41
3.1. Einleitung	41
3.1.1. Blüten der Mohnfamilie und ihre Bestäuber	41
3.1.2. Blütenfarbpolymorphismus	42
3.1.3. Fragestellungen	44
3.2. Material & Methoden	44
3.2.1. Untersuchungsgebiet und –zeitraum	44
3.2.2. <i>Anemone pavonina</i>	45
3.2.3. Reflexionsspektrum von <i>Anemone pavonina</i>	45

3.2.4. Farbmorphenverteilung	45
3.2.5. Blütenbesuche	46
3.2.6. Becherfallen	46
3.2.7. Bienenbesuche	47
3.3. Ergebnisse	47
3.3.1. Reflexionsspektrum von <i>Anemone pavonina</i>	47
3.3.2. Farbmorphenverteilung	49
3.3.3. Blütenbesuche	50
3.3.4. Becherfallen	52
3.3.5. Bienenbesuche	53
3.4. Diskussion	54
3.4.1. Reflexionsspektrum von <i>Anemone pavonina</i>	54
3.4.2. Farbmorphenverteilung	55
3.4.3. Blütenbesuche	57
3.4.4. Becherfallen	58
3.4.5. Bienenbesuche	59
4. Zusammenfassung Diskussion Teil I und Teil II	61
Literaturverzeichnis	62
Anhang	73
Lebenslauf	80

Abstract

Glaphyrid beetles of the genera *Pygopleurus* and *Eulasia* are the main pollinators of flowers of the so-called “poppy guild” in the East Mediterranean region. This guild consists of species of the genera *Tulipa*, *Ranunculus*, *Papaver*, *Adonis*, *Glaucium* and *Anemone*. They share certain characteristic traits like red, bowl-shaped flowers, a dark spot at the base of the corolla, and lack a strong scent. In contrast to the majority of the members of these genera, which usually reflect in the UV-range, the “poppy guild flowers” in the Mediterranean region seem to lack UV-reflectance. Behavioural tests have shown that various species of the glaphyrid genera *Pygopleurus* and *Eulasia* (“*Amphicoma*” *sensu* Dafni et al. 1990) prefer scentless, red-coloured flower models, suggesting that they are the pollinators of these flowers. Recent electrophysiological data on the visual system of *Eulasia pietschmanni* Breit (Coleoptera: Glaphyridae) have shown that the beetle possesses three photoreceptor types which peak in the UV, green and red part of the light spectrum. To explore the possibility of red-vision in these two genera, molecular investigations of the pupative visual pigment as well as field studies were conducted.

The investigation of the visual pigment resulted in the sequencing of an approximately 360-400 bp fragment of the long-wavelength opsin for the taxa *Pygopleurus diffusus* as well as *Eulasia pareyssei*. Unfortunately, efforts to obtain full length sequences were without success. NJ-analyses grouped the partial sequences in the long-wavelength cluster of the examined insect opsins. Comparisons with already known spectral tuning sites in butterflies were conducted to reveal possible amino acid substitutions which are responsible for a long-wavelength shift. Additional analyses of the mitochondrial CO1-region of four individuals of *Pygopleurus diffusus* and two individuals of *Eulasia pareyssei* were conducted to allow easier identification of species in future studies.

In a field study, I investigated the distribution and pollination biology of the colour polymorphic *Anemone pavonina*, a member of the poppy guild, in central Greece. The data suggest a strong correlation between altitude and flower colour. At altitudes between 500 and 1100m a.s.l. I found nearly exclusively red flowers; above 1200m nearly all flowers were found to be violet. Between 1100 and 1200m the populations comprise both colour morphs.

I counted the number of glaphyrid beetles of the genus *Pygopleurus* which visited red and violet flowers. The frequency of beetles found in red flowers was about ten times higher compared to the violet flowers. In contrast, honeybees (*Apis mellifera*) were found to prefer violet flowers over red flowers. In a behavioural experiment in which I presented flower models of six different colours, *Pygopleurus* spec. significantly preferred red and orange models compared to other colours.

Keywords: glaphyrid beetles, *Pygopleurus* spec., *Pygopleurus diffusus*, *Eulasia* spec., *Eulasia pareyssei*, “poppy guild”, *Anemone pavonina*, colour polymorphism, pollination, opsin-gene-characterization, red-receptor, spectral tuning, CO1-region, barcoding

Zusammenfassung

Die Gattungen *Pygopleurus* und *Eulasia* (Coleoptera: Glaphyridae) sind die wichtigsten Bestäuber von Blüten der sogenannten „Mohngilde“ in der östlichen Mittelmeer-Region. Diese Gilde beinhaltet die Gattungen *Tulipa*, *Ranunculus*, *Papaver*, *Adonis*, *Glaucium* und *Anemone*. Gemeinsame Charakteristika dieser Gattungen sind ihre roten, becher- bzw. schalenförmigen Blüten, ein dunkler Fleck an der Corolla-Basis sowie ein Fehlen von auffälligem Duft. Im Gegensatz zur Mehrheit der Vertreter dieser Gattungen, welche für gewöhnlich UV-Reflexion aufweisen, scheinen die Vertreter der „Mohn-Gilde“ in der Mittelmeer-Region nicht im UV-Bereich zu reflektieren. Verhaltensversuche haben gezeigt, dass verschiedene Arten der Gattungen *Pygopleurus* und *Eulasia* („Amphicoma“ *sensu* Dafni et al. 1990) geruchslose, rote Blütenmodelle bevorzugten, ein Hinweis darauf, dass sie die Bestäuber dieser Blüten sind. Kürzlich durchgeführte elektrophysiologische Untersuchungen am visuellen System von *Eulasia pietschmanni* Breit (Coleoptera: Glaphyridae) haben ergeben, dass dieser Käfer drei Photorezeptor-Typen besitzt, mit spektralen Empfindlichkeiten im UV-, Grün- und Rot-Bereich. Um der Möglichkeit, dass diese zwei erwähnten Gattungen möglicherweise Rotsichtigkeit aufweisen, nachzugehen, wurden sowohl Labor- als auch Freilandversuche durchgeführt.

Im ersten Teil meiner Arbeit versuchte ich das Opsin des Langwellenrezeptors von zwei Glaphyridenarten zu charakterisieren. Die Versuche lieferten ein etwa 360-400 bp langes Fragment eines Opsins für die Taxa *Pygopleurus diffusus* sowie *Eulasia*

pareyssei. Bemühungen, das komplette Gen zu sequenzieren, blieben leider erfolglos. NJ-Analysen gruppierten die gefundenen Sequenzen zu anderen Langwellen-Opsinen verschiedener Insektenarten, was darauf hindeutet, dass die Sequenzen tatsächlich von einem LW-Opisin der Käfer stammen. Vergleiche mit bereits bekannten Spectral Tuning Positionen bei Schmetterlingen wurden durchgeführt um Hinweise zu finden, dass das gefundene Opisin eine ins Langwellige verschobene spektrale Empfindlichkeit besitzt. Zusätzlich wurde noch die mitochondrielle CO1-Region von vier Vertretern von *Pygopleurus diffusus* sowie von zwei Vertretern von *Eulasia pareyssei* sequenziert, um für zukünftige Versuche ein leichteres Identifizieren der Arten zu erlauben („Barcoding“).

Im zweiten Teil meiner Arbeit untersuchte ich in Zentralgriechenland die Verteilung und Bestäubungsbiologie der farbpolymerpe Pfaunenaneone, *Anemone pavonina*, einem Mitglied der oben erwähnten Mohnilde. Die Ergebnisse der Freilanduntersuchungen lassen einen signifikanten Zusammenhang zwischen Höhenlage und Blütenfarbe erkennen. Auf Höhen zwischen 500 und 1000 Metern waren fast alle vorgefundenen Blüten rot, während sie über 1200 Meter fast ausschließlich violett waren. Im Bereich zwischen 1100 und 1200 Metern traten Mischpopulationen beider Farben auf.

Des weiteren wurden Besuchszahlen der Gattung *Pygopleurus* auf violetten und roten Blüten ermittelt. Der Anteil der auf roten Blüten gefundenen Käfer lag dabei um das Zehnfache höher als der auf violetten Blüten. Im Gegensatz dazu bevorzugte die Honigbiene (*Apis mellifera*) die violette Farbvariante. In einem durchgeführten Experiment mit Blütenmodellen in sechs verschiedenen Färbungen bevorzugte *Pygopleurus* signifikant häufiger rote und orange Blüten im Vergleich zu den anderen vier Farben.

Schlagwörter: Glaphyridae, *Pygopleurus spec.*, *Pygopleurus diffusus*, *Eulasia spec.*, *Eulasia pareyssei*, „Mohnilde“, *Anemone pavonina*, Farbpolymorphismus, Bestäubung, Opisin-Gen-Charakterisierung, Rot-Rezeptor, Spectral Tuning, CO1-Region, Barcoding

1. Allgemeine Einleitung

Obwohl viele Informationen über das Farbsehen bei Hymenoptera und Lepidoptera zur Verfügung stehen, ist nur wenig über das Farbsehen anderer Insekten bekannt. So ist z.B. das Farbsehen der Coleoptera und die in dieser Gruppe beschriebene Rotsichtigkeit noch kaum untersucht, Daten liegen nur für vereinzelte Arten aus wenigen Familien vor (Briscoe & Chittka 2001). Verhaltensversuche bei Käfern aus der Familie der Glaphyridae etwa deuten auf eine eventuell vorhandene Fähigkeit zur Perzeption der Farbe Rot hin (Dafni et al. 1990; Dafni 1997).

Auch elektrophysiologische Untersuchungen bei *Carabus nemoralis* sowie *Carabus auratus* (Coleoptera: Carabidae) (Hasselmann 1962), den Weibchen von *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) (Crook et al. 2009) sowie bei einem Vertreter der Familie Glaphyridae, *Eulasia pietschmanni* Breit, (Martinez-Harms et al. unveröffentlicht) deuten auf eine hohe Sensitivität des visuellen Systems für langwelliges (rotes) Licht hin. *E. pietschmanni* z.B. scheint Empfindlichkeiten im UV-, Grün- und Rot-Bereich aufzuweisen, während ein Blaurezeptor dagegen nicht lokalisiert werden konnte (Martinez-Harms et al. unveröffentlicht). Das spektrale Empfindlichkeitsmaximum im Rot-Bereich bei *Eulasia pietschmanni* hat einen Peak bei 628 nm und ist somit einer der höchsten je im Insektenreich gemessenen Werte. Die Empfindlichkeiten der drei Rezeptortypen lassen auch vermuten, dass das Farbsehen der Käfer der Familie Glaphyridae im speziellen auf die Unterscheidung roter und orangefarbener Blüten vom grünen Hintergrund (Gras, Blattwerk) ausgerichtet und weniger gut dazu geeignet ist, zwischen unterschiedlichen Blütenfarben zu unterscheiden (Martinez-Harms et al. unveröffentlicht).

Das Farbsehen der Käfer spielt eine entscheidende Rolle bei ihrer Funktion als Blütenbesucher und –bestäuber. Mehr als 184 Angiospermenfamilien werden fast ausschließlich von Käfern bestäubt, die insgesamt 85 Gattungen aus 34 Familien umfassen (Bernhardt 2000). Die Bestäubung durch Käfer ist nicht nur auf basale Angiospermengruppen beschränkt, sondern ist auch in sehr hoch entwickelten Vertretern der Angiospermen zu finden. Es ist schon länger bekannt, dass die Evolution der Angiospermen maßgeblich von den sie bestäubenden Käfern beeinflusst und getriggert wurde (Gottsberger 1977). Im Gegenzug entwickelten viele Vertreter der Coleoptera spezialisierte Strukturen, die ihnen das Sammeln und Verarbeiten von Pollen und Nektar erleichterten. So erweist sich etwa eine lange, dichte Behaarung als

vorteilhaft, da daran der Pollen besonders gut haften bleibt (Crowson 1981; Dafni et al. 1990).

Käferblütigkeit oder Cantharophilie wird im Allgemeinen mit charakteristischen Düften assoziiert, wie etwa dem Geruch nach Fäkalien. Ebenfalls beschrieben wurden moschusartige, honigähnliche oder fruchtige Gerüche (u.a. Bernhardt 2000; Dafni et al. 1990; Dieringer et al. 1999; Sakai et al. 1999). Allerdings scheinen manche Blüten für den Menschen nur schwache oder gar keine Gerüche aufzuweisen. Die Färbung typischer Käferblüten ist meist unscheinbar, durch das Vorherrschen von cremefarbenen, grünlich-weißen, weißen, leicht pinken, gelblichen oder bräunlichen Tönen (Bernhardt 2000; Dafni et al. 1990).

Dennoch gibt es Ausnahmen, wie etwa die Blüten der „Mohngilde“ im Mittelmeergebiet und im Nahen Osten, die eine rote Färbung ihrer Kronblätter aufweisen, allerdings keinerlei Reflexion im UV-Bereich (Dafni et al. 1990; Menzel & Shmida 1993). Diese Blüten werden bevorzugt von Käfern der Fam. Glaphyridae besucht und bestäubt (Dafni et al. 1990; Bernhardt 2000). Die ersten Hinweise, dass Käfer der Gattung *Amphicoma* (Coleoptera: Glaphyridae) eventuell solche roten Blüten bevorzugen könnten, stammen von Ivri (1985). Seine Meinung, dass Vertreter dieser Gattung tatsächlich rote Blüten bevorzugen, stand somit in komplettem Widerspruch zu den damals herrschenden Ansichten über die Cantharophilie, nämlich dass Käferblüten typischerweise unscheinbare Farben besitzen (siehe Kap.3.1). Pollen ist die einzige Belohnung, die Blüten der Mohngilde anbieten, während entweder keine Nektar-Sekretion vorhanden oder diese nur extrem gering ist (Dafni et al. 1990; Goldblatt et al. 1998). Ein weiterer Grund für die Käfer, die Blüten aufzusuchen, scheint auch in der Suche nach Paarungspartnern zu liegen, wobei beide Geschlechter große Blüten im Vergleich zu kleineren deutlich zu bevorzugen scheinen (Dafni et al. 1990; Dafni 1997; Keasar et al. 2009). Des Weiteren werden die Blüten von den Käfern auch als Schlafplätze genutzt (persönliche Beobachtung sowie Erwähnung in Horovitz 1991 und Keasar et al. 2008). Bei *Anemone coronaria* etwa wird davon ausgegangen, dass sowohl der Öffnungs- und Schließmechanismus des Perianths als auch dessen Färbung als Anpassungen zu sehen sind, um den Bestäubern einen Schlafplatz mit Schutzfunktion zu bieten, da im Inneren der Blüte sowohl Temperatur als auch Feuchtigkeit reguliert sind, wobei Käfer der Familie Glaphyridae bevorzugt in solchen Blüten übernachten,

die dunkle, wenig reflektierende Blüten aufweisen, wie etwa solche mit roter Färbung (Horovitz 1991).

Insgesamt besuchen allerdings nur sehr wenige Käfer-Arten rote Blüten. Neben einzelnen Vertretern der Glaphyridae, die vereinzelt rote Blüten zu besuchen scheinen, ist dieses Verhalten auch bei Vertretern des Tribus *Hopliini* (Scarabaeidae, Rutelinae) beschrieben worden (Mayer et al. 2006; Picker & Midgley 1996).

2. Teil I: Charakterisierung des Langwellen-Opsins und der CO1-Region

2.1. Einleitung

2.1.1. Das visuelle System der Insekten: Photopigmente und Phototransduktion

Phototransduktion findet bei Insekten in den Komplexaugen statt, die lichtempfindliche Rezeptoren enthalten. Das Sehpigment, Rhodopsin – eingebettet in spezialisierte Membranabschnitte der Retinulazelle –, besteht aus einem lichtabsorbierenden Chromophor, welches sich für gewöhnlich aus 11-*cis*-Retinal oder aber in selteneren Fällen aus 11-*cis*-3-Hydroxyretinal, Aldehyden von Vitamin A, herleitet. Die zweite Komponente des Rhodopsins bildet ein Apoprotein (=Opsin), welches durch die sogenannte „Schiff“sche Base“ kovalent mit dem Chromophor verbunden ist und zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählt. Opsine sind durch 7 transmembrane α -helicale Domänen charakterisiert, welche eine Tasche um das lichtempfindliche Chromophor herum bilden. Das Sehpigment selbst wird in den Rhabdomeren der Photorezeptorzellen exprimiert (u.a. Briscoe 2001, 2002; Filipek et al. 2003; Salcedo et al. 2009; Seki & Vogt 1998; Smith & Goldsmith 1990; Wald 1968).

Die Umwandlung von Licht in ein neuronales Signal in tierischen Sehzellen beginnt mit der Absorption von Photonen durch die Sehpigmente, wodurch die Photoisomerisation ausgelöst wird. Dabei wird das 11-*cis*-Retinal in all-*trans*-Retinal umgewandelt und im Opsin eine Konformationsänderung ausgelöst. Diese Änderung führt zur Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins Transducin, was eine biochemische Kaskade auslöst, welche schlussendlich eine Ausschüttung von Neurotransmittern nach sich zieht. Infolge dieser Signal-Transduktionskaskade wird das Membranpotential der Photorezeptorzelle verändert. Dem Nervensystem wird so durch dieses elektrische Signal übermittelt, dass Licht wahrgenommen wurde (u.a. Briscoe 2000, 2001; Kouyama & Murakami 2008; Wakakuwa et al. 2004).

Sehpigmente zeichnen sich durch charakteristische maximale Absorptionsspektren (λ_{\max}) aus, die durch bestimmte Aminosäure-Seitenketten moduliert werden können, wenn diese der bindenden Tasche des Chromophors zugewendet sind. Die Aminosäuren des Opsins legen also gemeinsam mit dem Chromophor die spektrale Empfindlichkeit eines Photorezeptors fest (u.a. Briscoe 2001, 2002; Wakakuwa et al. 2004).

2.1.2. Spektrale Empfindlichkeiten im Insektenreich

Fast alle bislang untersuchten Insekten-Opsine fallen in 3 spektrale Klassen: UV, Blau und Grün (=Langwelle, LW). Diese genetischen Klassen decken sich sehr gut mit physiologischen Einteilungen der spektralen Empfindlichkeit bei Insekten. Das Vorhandensein aller drei Photorezeptor-Klassen in primitiven Insekten deutet darauf hin, dass das trichromatische Sehen sehr früh entstanden und hochkonserviert ist (Briscoe & Chittka 2001; Chittka 1997). UV- und Blau-Opsine weisen maximale spektrale Empfindlichkeiten im Bereich von 300-400 bzw. 400-500 nm auf. Die Photorezeptoren von LW-Opsinen zeigen Empfindlichkeiten zwischen 480 und etwa 600 nm (u.a. Briscoe & Chittka 2001; Kelber 2006; Stavenga & Arikawa 2006).

Allerdings weisen nicht alle Taxa alle drei Rezeptortypen auf oder aber haben mehr als drei. Vor allem Rot-Rezeptoren ($\lambda_{\max} > 565$ nm) sind im Insektenreich eher selten, scheinen aber mehrmals unabhängig entstanden zu sein (Briscoe & Chittka 2001). Diese Entwicklung vollzog sich innerhalb der Odonata (u.a. Meinertzhagen et al. 1983; Yang & Osorio 1991), Hymenoptera (u.a. Peitsch et al. 1992; Kretz 1979; Labhart 1986; Wittmann et al. 1990), Coleoptera (u.a. Hasselmann 1962; Martinez-Harms et al. unveröffentlicht) sowie vermutlich mehrmals innerhalb der Lepidoptera, wobei einige Schmetterlings-Arten sogar mehr als einen Rot-Rezeptor aufweisen (u.a. Arikawa et al. 1987; Bernard 1979; Bernard & Remington 1991; Briscoe & Chittka 2001; Eguchi et al. 1982; Frentiu et al. 2007a; Ichikawa & Tateda 1982; Kelber 1999; Kinoshita et al. 1999; Matic 1983; Paul et al. 1986; Qiu & Arikawa 2003a, 2003b; Steiner et al. 1987; Wakakuwa et al. 2004).

Da Rot-Rezeptoren unter Arthropoden insgesamt und Insekten im speziellen eher selten sind, könnte ihre Existenz bei den Glaphyridae auf einen sekundären Erwerb später im Laufe ihrer Evolution hindeuten. Demnach wäre ein Verlust des Blau-Opsins bei einigen Coleoptera-Arten durch das Entstehen von Rot-Rezeptoren ausgeglichen

worden, wodurch wieder trichromates Sehen möglich wäre (Martinez-Harms et al. unveröffentlicht).

2.1.3. Molekulare Daten zur Langwellen-Perzeption bei Käfern

Neben den bereits in Kap.1 erwähnten elektrophysiologischen Daten liegen auch einige Untersuchungen aus dem molekularbiologischen Bereich vor, wobei molekulare Daten über LW-Opsine bei Käfern bislang ebenfalls eher selten sind. So wiesen etwa Jackowska et al. (2007) bei *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae) ein UV- und ein LW-Opsin nach, wohingegen der Blau-Rezeptor offensichtlich verloren gegangen ist. Ob es sich bei diesem Langwellenrezeptor aber um einen Grün- oder Rotrezeptor handelt, wurde bislang nicht näher untersucht. Diese Erkenntnisse decken sich allerdings mit ERG-Daten der nahe verwandten Art *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae), bei der Peaks der Absorptionsmaxima nur im UV- und Langwellen-Bereich nachgewiesen werden konnten (Yinon 1970).

Oba & Kainuma (2009) untersuchten *Luciola cruciata* (Lampyridae) und fanden ebenfalls Hinweise auf UV- und LW-Opsine. Wiederum konnte kein Nachweis eines Blau-empfindlichen Rezeptors erbracht werden. Auch diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit einer vorhergehenden Studie, bei der die Autoren mittels ERGs feststellten, dass *L. cruciata* zwei Empfindlichkeitsmaxima im UV- und Langwellen-Bereich aufweist (Eguchi et al. 1984).

Maksimovic et al. (2009) untersuchten die Opsin-Gene von *Thermonectus marmoratus* (Dytiscidae) und fanden Hinweise auf zwei UV-Rezeptoren und einen Langwellen-Rezeptor. Wu (2008) wies bei *Tribolium confusum*, *Tenebrio molitor* und *Zophobas atratus* (alle drei gehören zur Familie Tenebrionidae) ebenfalls UV- und LW-Opsine nach. Der Autor geht von einem sehr frühen Verlust des Blau-Rezeptors in der Evolution der Schwarzkäfer (*Tenebrionidae*) aus. Somit wäre dichromatisches Farbsehen ein ancestrales Merkmal dieser Familie.

2.1.4. Entstehungsmöglichkeiten für Rot-Rezeptoren

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie Rot-Rezeptoren hätten entstehen können. Die eine Möglichkeit besteht in der Genduplikation des Grünrezeptors. Langwellen-Pigmente haben sich durch Genduplikation diversifiziert in Gruppen wie etwa Primaten oder Lepidoptera (Osorio & Vorobyev 2005). Trichromates Sehen entstand so zum Beispiel

bei Altwelt- sowie Neuweltaffen durch unabhängige Duplikation des ancestralen LW(Grün)-Opsin-Gens (u.a. Dulai et al. 1999; Nathans 1999; SurrIDGE et al. 2003). Auch die 5 Hauptklassen der Vertebraten-Opsine sind durch Duplikation eines ancestralen Retinal-Opsins entstanden (u.a. Chang et al. 1995; Spady et al. 2006; Yokoyama 1994).

Die Duplikation von Opsin-Genen ist v.a. auch unter den Teleostei, den Knochenfischen im engeren Sinne, weit verbreitet (Spady et al. 2006). So konnten Duplikationen aller 4 Zapfen-Opsin-Klassen bei mehreren Taxa nachgewiesen werden (u.a. Carleton & Kocher 2001; Chinen et al. 2003; Fuller et al. 2003, 2004; Hoffmann et al. 2007; Matsumoto et al. 2006; Yokoyama & Yokoyama 1990). Auch im Insektenreich traten Duplikationen der Opsin-Gene bereits früh in der Entwicklungsgeschichte dieser Tierklasse auf (Spaethe & Briscoe 2004). Vor allem innerhalb der Lepidoptera ließen sich bei vielen Taxa Duplikationen einer oder mehrerer Opsin-Klassen nachweisen (u.a. Arikawa et al. 2005; Briscoe 2000, 2001, 2002; Frentiu et al. 2007a; Kitamoto et al. 1998; Wakakuwa et al. 2004).

Die andere Möglichkeit besteht im sogenannten „spectral tuning“, welches fast immer als Folge der Gen-Duplikation auftritt. Dabei werden die spektralen Empfindlichkeitsmaxima durch Substitutionen von Aminosäuren an bestimmten Positionen des Opsins so verändert, dass diese Maxima entweder in den kürzer- oder langwelligeren Bereich geshiftet werden können. Wechselwirkungen des Chromophors mit diesen entscheidenden Aminosäuren führen dann zu einem Verschieben der maximalen Empfindlichkeit (u.a. Briscoe 2001; Carleton & Kocher 2001; Frentiu et al. 2007a; Yokoyama & Radlwimmer 1999, 2001; Zhukovsky & Oprian 1989). Generell scheint es so zu sein, dass Aminosäure-Positionen, die außerhalb der 7 Transmembranbereiche liegen, keinen oder nur einen geringen Einfluss auf das Spectral Tuning ausüben (Chang et al. 1995; Nathans et al. 1986; Yokoyama & Yokoyama 1990; Yokoyama & Radlwimmer 1998).

Die spektrale Empfindlichkeit der Sehpigmente wird in hohem Maß durch die funktionelle Gruppe des Opsins bestimmt (Pichaud et al. 1999). Aus diesem Grund haben sich auch viele Autoren mit der Identifizierung von Aminosäure-Positionen beschäftigt, die entscheidend für das Spectral Tuning sind. Einzelne Aminosäure-Substitutionen können dabei je nach ihrer Position und Interaktion mit dem

Chromophor Shifts bis zu > 30nm bewirken (u.a. Asenjo et al. 1994; Yokoyama 2000). Ein bereits gut untersuchter Mechanismus für Spectral Tuning, besonders in Vertebraten, ist der Austausch zwischen Aminosäuren unterschiedlicher Polarität in der bindenden Tasche des Chromophors (u.a. Asenjo et al. 1994; Neitz et al 1991; Yokoyama & Yokoyama 1990).

Beispiele für Anpassungen der Sehpigmente durch Aminosäure-Substitutionen sind u.a. im Entstehen von Rot- und Grünsichtigkeit bei Primaten sowie dem Menschen zu finden (u.a. Chan et al. 1992; Dulai et al. 1999; Neitz et al. 1991; Shyue et al. 1998; Williams et al. 1992; Yokoyama & Radlwimmer 1998), dem Entstehen von UV-Sichtigkeit bei Vögeln (u.a. Shi & Yokoyama 2003; Wilkie et al. 2000; Yokoyama et al. 2000) sowie Shifts im Kurzwellenbereich bei anderen Vertebraten zwischen UV- und Blausichtigkeit (u.a. Cowing et al. 2002b; Deeb et al. 2003; Fasick et al. 2002; Parry et al. 2004; Shi et al. 2001; Yokoyama & Shi 2000; Yokoyama et al. 2006). Ebenfalls gut untersuchte Beispiele sind Blau-Verschiebungen der Empfindlichkeit bei in größeren Tiefen lebenden Fischen (u.a. Bowmaker et al. 1994; Chinen et al. 2003; Cowing et al. 2002a; Hope et al. 1997; Hunt et al. 1996, 2001; Yokoyama et al. 1999; Yokoyama et al. 2007) sowie in größerer Tiefe jagenden Meeressäugern (Fasick & Robinson 1998, 2000). Weitere Beispiele für Spectral Tuning sind das Entstehen der Grünsichtigkeit aus ursprünglicher Rotsichtigkeit bei Mäusen durch Blau-Shifts (Sun et al. 1997), Verschiebungen in den längerwelligen Bereich bei Blau-Rezeptoren bei Molchen (Takahashi & Ebrey 2003) und Hühnern (Imai et al. 1997), sowie spektrale Anpassungen bei Salamandern (Makino et al. 1999).

Unterschiede in der spektralen Empfindlichkeit zwischen dem Rot- und Grünrezeptoren werden bei Vertebraten durch 5 bis 7 Aminosäuren bestimmt, die eine additive Wirkung auszuüben scheinen (Yokoyama & Radlwimmer 1999). Insgesamt unterscheiden sich beim Menschen die rot- und grünempfindlichen Sehpigmente an 15 AS-Positionen, aber vermutlich spielen nur 5-7 eine Rolle für das Spectral Tuning, da diese innerhalb der Transmembranbereiche liegen (u.a. Asenjo et al. 1994; Merbs & Nathans 1993; Nathans et al. 1986; Sun et al. 1997; Yokoyama & Radlwimmer 1998, 1999). In typischen Rot-Opsinen sind Positionen 180 durch Ser, 197 durch His, 277 durch Tyr, 285 durch Thr und 308 durch Ala besetzt (Nummerierung entspricht *Homo sapiens* Rot-Opisin) (Yokoyama & Radlwimmer 1998, 1999, 2001). Für den 30 nm Rot-Shift zwischen dem Grün- und Rotrezeptor sind vermutlich drei dieser Positionen – 180, 277 und 285 (die

Positionen entsprechen 164, 261 respektive 285 im Bovine Rhodopsin) – hauptverantwortlich, da diese nahe am Chromophor liegen und zwischen den beiden Rezeptortypen an jeder Position ein Austausch einer Aminosäure mit unpolaren Resten (im grünen Sehpigment) durch eine polare Aminosäure mit Hydroxyl-Gruppe (im roten Pigment) stattgefunden hat (Asenjo et al. 1994; Kleinschmidt & Harosi 1992; Merbs & Nathans 1992, 1993; Neitz et al. 1991; Yokoyama & Yokoyama 1990; Yokoyama & Radlwimmer 2001).

Spectral tuning ist bei Vertebraten ein gut untersuchtes Phänomen, bei Invertebraten dagegen ist vergleichsweise wenig bekannt (Briscoe 2002; Britt et al. 1993). Allerdings wurden vor allem im letzten Jahrzehnt mehrere Studien über Spectral Tuning bei Schmetterlingen publiziert (u.a. Briscoe 2000, 2001, 2002; Chase et al. 1997; Frentiu et al. 2007a, 2007b). Ebenfalls wurden Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* durchgeführt (Salcedo et al. 2009). Auch etwa über Mollusken (Bellingham et al. 1998), Hymenopteren (Spaethe & Briscoe 2004) sowie Crustacea (Crandall & Cronin 1997; Cronin et al. 2000) wurden Untersuchungen zum Spectral Tuning durchgeführt.

2.1.5. Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen zu beantworten versucht:

1. Zum einen sollte die Gen-Sequenz des LW-Opsins von Vertretern zweier Taxa der Familie Glaphyridae molekular charakterisiert werden.
2. Gibt es Hinweise darauf, dass es sich um einen Rot-Rezeptor handelt? Wenn ja, was war der entscheidende Mechanismus für die Entstehung eines solchen?
3. Da die verschiedenen Käferarten oftmals schwierig zu bestimmen sind, sollte die CO1-Region der in der Opsin-Analyse verwendeten 3 Käferindividuen sowie weiterer Käfer von den jeweils selben Fundorten sequenziert werden, um in zukünftigen Studien eine Artbestimmung zu erleichtern („Barcoding“).

2.2. Material & Methoden

2.2.1. Opsin-Gen-Sequenzierung

2.2.1.1. Versuchszeitraum, Versuchstiere

Die Versuche zur Opsin-Gen-Sequenzierung wurden von Ende Oktober 2009 bis Ende August 2010 durchgeführt. Zur Analyse wurden 3 Käfer der Fam. Glaphyridae herangezogen. Ein Exemplar der Art *Pygopleurus diffusus* Petrovitz (fortan als

Individuum **Pygo A** bezeichnet) wurde Anfang April 2010 von O. Univ.-Prof. Dr. Hannes Paulus am Hügel Kefala (Insel Kreta, Griechenland) gefangen. Individuen **Pygo C** (ebenfalls *Pygopleurus diffusus* Petrovitz) und **Eulasia E** (*Eulasia pareyssei* Brullé) wurden von der Autorin selbst Anfang Mai 2010 in Thessalien, Griechenland, gefangen. Individuum **Pygo C** wurde am Standort 8, Individuum **Eulasia E** am Standort „Mistkäfer-Stelle“ gefangen. Für den genauen Fundort siehe Anhang, Tab.4. Die Identifizierung der Individuen erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Dr. Guido Sabatinelli.

Bei Individuum **Pygo A** wurde sofort nach dem Fang der Kopf entfernt, in RNAlater® (Sigma Aldrich) transferiert und nach der Heimkehr bei -80°C eingefroren. Der Restkörper wurde in 96% Ethanol konserviert. Individuen **Pygo C** und **Eulasia E** wurden lebend aus Griechenland mitgebracht, durch Kälte euthanasiert und bei -80°C gelagert.

2.2.1.2. RNA-Extraktion

Folgende Methode nach Pamminer (2008) wurde zur RNA-Extraktion angewendet: Zuerst wurde der in RNAlater® (Sigma Aldrich) und bei -80°C konservierte Kopf (**Pygo A**) bzw. der komplette Körper (**Pygo C** und **Eulasia E**) der Tiere aufgetaut. Bei Individuen **Pygo C** und **Eulasia E** wurde danach der Kopf mit einem sterilen Skalpell abgetrennt. Anschließend wurden die Köpfe in je ein 1.5 mL Eppendorf-Röhrchen mit 1 mL „ISOL-RNA lysis reagent“ (5 PRIME) transferiert, und mit einem Stößel so gut wie möglich zerstoßen, um eine gute Homogenisierung zu gewährleisten. Die homogenisierte Lösung wurde für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert, um die Auflösung der Nukleoprotein-Komplexe zu fördern.

Anschließend wurden 200 µL Chloroform hinzugefügt. Nach dem Schütteln der Proben für etwa 15 sec. wurden sie 15 min. lang bei 4°C mit 12.000 x g zentrifugiert (Sigma 1-15K), was eine Auftrennung in 3 Phasen verursachte: die oberste, RNA-beinhaltende aquatische Phase, die mittlere weiße Zwischenphase und die rote organische Phase unten, die die DNA und Protein-Komponenten beinhaltete. Die aquatische Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette in ein neues 1.5 mL Eppendorf-Röhrchen transferiert. 500 µL Isopropanol wurden der Lösung zugesetzt und die Proben gründlich gevortext (IKA Vortex Genius 3).

Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 10 min. bei 4°C mit 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig verworfen und 1 mL 70% Ethanol zum am Boden des Röhrchens klebenden Pellet hinzugefügt. Die Proben wurden umgehend für 5 min. bei Raumtemperatur mit 7.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend komplett entfernt und das Pellet kurz luftgetrocknet.

Danach wurde die RNA in 60 µL DNase/RNase freiem Wasser resuspendiert und 15 µL Aliquots umgehend bei -80°C eingefroren. Der RNA-Gehalt und der Verunreinigungsgrad der Proben wurden mit einem BioPhotometer 6131 (Eppendorf) vermessen und die RNA-Konzentration sowie die 260nm/280nm- und die 260nm/230nm-Werte protokolliert.

2.2.1.3. cDNA-Synthese / Reverse Transkription

1 µg RNA wurde zur cDNA-Synthese eingesetzt. Verwendet wurde hierfür der „Bio Rad iScript cDNA Synthesis Kit“ (Bio-Rad). Die 20 µL Reaktionslösung beinhaltete folgende Komponenten:

4 µL	5x iScript Reaction Mix
2 µL	oligo (dT) Primer
1 µL	iScript Reverse Transcriptase
x µL	RNA (Volumen, welches 1 µg entspricht)
x µL	H ₂ O (Restvolumen, abhängig von der RNA-Menge)

Den Empfehlungen des Herstellers folgend wurde die Lösung mit einem Mastercycler personal (Eppendorf) für 5 min. bei 25°C inkubiert, gefolgt von 60 min. bei 42°C und 5 min. bei 85°C.

2.2.1.4. Primer

1 Primerset (*Beetle LW2 f* + *Beetle LW6 r*, Tab.2) lieferte Fragmente des Langwellen-Opsins der untersuchten Käfer. Weitere Primer wurden verwendet, lieferten aber keine Ergebnisse, deshalb werden jene Primer an dieser Stelle nicht weiter erwähnt.

Beim Forward-Primer *Beetle LW2 f* handelt es sich um einen degenerierten Primer. Der zum Design dieses Primers herangezogene und danach selbst veränderte Primer (*Oba LW1 f*) wurde ursprünglich in einer anderen Studie (Oba & Kainuma 2009) bei der Langwellen-Opsin-Charakterisierung von *Luciola cruciata* (F. Lampyridae, ÜF.

Cantharoidea, UO. Polyphaga) eingesetzt. Durch Alignierung dieser Sequenz mit einer weiteren Sequenz von *Thermonectus marmoratus* (F. Dytiscidae, ÜF. Caraboidea, UO. Adepfaga) sowie von *Tribolium castaneum* (F. Tenebrionidae, ÜF. Cucujoidea, UO. Polyphaga) im Programm „BioEdit 7.0.0“ wurde dieser Primer so verändert und mit *wobble*-Positionen versehen (=degenerierter Primer), dass er für alle drei Käfer-Sequenzen passend wurde, um die Variation zwischen den Käfern soweit als möglich abzudecken. Die verwendeten Sequenzen stammen aus der Genbank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (Tab.1).

Tab.1: Die Vergleichssequenzen für die Primer-Alignments. Angeführt sind die jeweiligen Taxa, mit denen die Primer aligniert wurden, welcher Art die Sequenz-Information war (genomisch oder mRNA) und deren Genebank Accession Number.

Taxon	Sequenz	Genebank Accession Number
<i>Tribolium castaneum</i>	Genomisch	NW_001092827.1
<i>Tribolium castaneum</i>	mRNA	NM_001162519
<i>Luciola cruciata</i>	mRNA	AB300328.1
<i>Thermonectus marmoratus</i>	mRNA	EU921225.1

Beim Reverse-Primer *Beetle LW6 r* handelt es sich ebenfalls um einen degenerierten Primer. Dieser wurde manuell anhand des Alignments der beiden Sequenzen von *Tribolium castaneum* und *Luciola cruciata* designed und an den entsprechenden Positionen mit *wobbles* versehen. Die erwartete Produktlänge des verwendeten Primer-Paars lag bei etwa 400 bp.

Alle zum Einsatz gekommenen Primer wurden von der Firma VBC Biotech (Wien) synthetisiert. Für weitere Details über die Primer *Beetle LW2 f* sowie *Beetle LW6 r* siehe Tab.2, für nähere Informationen über die nicht erfolgreichen Primer siehe Anhang, Tab.1.

Tab.2: Die erfolgreiche Primerkombination. Ihre jeweilige Position in der *Tribolium castaneum*-Sequenz (mRNA) ist in Basenpaaren [bp] angegeben. Degenerierte Positionen (*wobble*-Positionen) sind grün markiert.

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5'-3')	Position in mRNA [bp]	Herkunft
<i>Beetle LW2 f</i>	TACGTSCCRGAAGGNAAATGAC	580-602	Modifizierter <i>Oba LW1f</i> , Oba & Kainuma (2009), Alignierung mit <i>Tribolium</i> , <i>Luciola</i> , <i>Thermonectus</i>
<i>Beetle LW6 r</i>	GCTTGTCTGTAYTTTGGATG	1006-1025	neu designed ausgehend von Alignment von <i>Tribolium</i> und <i>Luciola</i>

2.2.1.5. PCR, Aufreinigung, Sequenzierung

Der 20 μ L Reaktionsansatz für die PCR beinhaltete folgende Komponenten:

2 μ L	dNTPs (Fermentas)
2 μ L	Puffer (Fermentas)
0.1 μ L	Taq-Polymerase (Fermentas)
0.5 μ L	Forward-Primer (<i>Beetle LW2 f</i>)
0.5 μ L	Reverse-Primer (<i>Beetle LW6 r</i>)
1 μ L	cDNA
13.9 μ L	H ₂ O

Folgendes PCR-Programm mit den Thermocyclern realplex2 Mastercycler epgradientS (Eppendorf) bzw. Mastercycler personal (Eppendorf) wurde verwendet: 1 min. bei 94°C (Initialdenaturierung), gefolgt von 35 Zyklen mit 1 min. bei 94°C (Denaturierung), 30 sec. bei 42°C (Annealing) und 1 min. bei 72°C (Elongation) mit einem abschließenden finalen Elongationsschritt von 5 min. bei 72°C. Die anschließende Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit 1 μ L ExoSAP pro 5 μ L Probe. ExoSAP wurde in jeweils 500 μ l-Ansätzen hergestellt, bestehend aus 445 μ l ddH₂O, 5 μ l Exonuklease I und 50 μ l SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) (alle Komponenten stammen von Fermentas).

Die Sequenzreaktion erfolgte in Form einer zyklischen Sequenzierung, beruhend auf der Didesoxymethode nach Sanger. Verwendet wurde hierzu der „BigDye Ready Reaction Mix“ (Applied Biosystems, ABI), der bereits Polymerase, MgCl₂, Puffer, dNTPs und fluoreszenzmarkierte ddNTPs enthält, sodass nur noch Primer, Sequenzierpuffer, Template und ddH₂O zugegeben werden mussten. Zusätzlich wurde zum Ansatz stets das Detergens Tween20 (verdünnt 1:100) zugegeben. Jeder Ansatz wies dabei ein Gesamtvolumen von 10 μ l auf und bestand aus folgenden Komponenten: 1.5 μ l „BigDye Ready Reaction Mix“, 1 μ l Sequenzierpuffer, 1 μ l Primer, 1 μ l Tween20, 3 μ l Template und 2.5 μ l ddH₂O.

Die Sequenzierung erfolgte dabei stets sowohl in Forward- als auch in Reverse-Richtung und wurde am Department für Evolutionsbiologie der Universität Wien mit einem ABI Automated Sequencer (Applied Biosystems ABI) von Mag. Dr. Johannes Rath durchgeführt.

2.2.1.6. Phylogenetische Analyse

Die erhaltenen Sequenzen wurden zuerst einem BLAST-Search der GeneBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) unterzogen, um festzustellen, ob es sich bei den Fragmenten tatsächlich um Abschnitte des LW-Opsin Gens handelt. Anschließend wurden Neighbour Joining (NJ) Analysen der drei im Laufe der Arbeit erhaltenen Käfer Opsin-Sequenzen (Individuen *Pygo A*, *Pygo C* und *Eulasia E*) sowie weiterer 25 Opsin-Sequenzen anderer Insekten-Taxa durchgeführt. Die entsprechenden „GeneBank accession numbers“ sind in Tab.3 angeführt. Dafür wurden alle Aminosäure-Sequenzen zuerst mit dem Programm BioEdit 7.0.0 aligniert und anschließend im Programm „MEGA 4“ ein NJ-Baum (Complete Deletion, 1000 Replikate, unrooted, Bootstrap-Support > 50%) errechnet.

Tab.3: Die für die Erstellung des NJ-Baums herangezogenen Vergleichssequenzen. Angeführt sind die jeweiligen Taxa, die Opsinklasse (LW, UV, Blau, Blau-Grün) und deren jeweilige Genebank Accession Number.

Taxon	Opsin	GeneBank Accession Number
<i>Tribolium castaneum</i>	LW	NM_001162519.1
<i>Tribolium castaneum</i>	UV	XM_965251.1
<i>Thermonectus marmoratus</i>	LW	EU921225.1
<i>Thermonectus marmoratus</i>	UV1	EU921226.1
<i>Thermonectus marmoratus</i>	UV2	EU921227.1
<i>Luciola cruciata</i>	LW	AB300328.1
<i>Luciola cruciata</i>	UV	AB300329.1
<i>Sphodromantis ssp.</i>	LW	X71665.1
<i>Papilio glaucus Rh1</i>	LW	AF077189.1
<i>Papilio glaucus Rh2</i>	LW	AF077190.1
<i>Papilio glaucus Rh3</i>	LW	AF067080.1
<i>Papilio glaucus Rh4</i>	LW	AF077193
<i>Papilio glaucus Rh5</i>	UV	AF077191.1
<i>Papilio glaucus Rh6</i>	Blau	AF077192.1
<i>Apis mellifera</i>	LW1	NM_001011639.2
<i>Apis mellifera</i>	LW2	NM_001077825.1
<i>Apis mellifera</i>	Blau	AF004168.1
<i>Apis mellifera</i>	UV	AF004169.1
<i>Drosophila melanogaster Rh1</i>	Blau-Grün	K02315.1
<i>Drosophila melanogaster Rh2</i>	Blau-Grün	M12896.1
<i>Drosophila melanogaster Rh3</i>	UV	M17718.1
<i>Drosophila melanogaster Rh4</i>	UV	NM_057353.3
<i>Drosophila melanogaster Rh5</i>	Blau	U67905.1
<i>Drosophila melanogaster Rh6</i>	LW	Z86118.1
<i>Schistocera gregaria</i>	Blau	X80072.1

Um die variablen AS-Positionen im Opsin zwischen den Käferarten in Relation zum Chromophor zu verdeutlichen, wurde ein Homologiemodell ausgehend von einer 3D-Kristallstruktur des Rhodopsins von *Loligo forbesi* (Hall et al. 1991; GeneBank

Accession Number: X56788.1) erstellt. Dazu wurde das Programm „UCSF Chimera“ verwendet.

Abschließend wurde einschlägige Fachliteratur nach bislang bekannten Spectral Tuning Positionen durchsucht. Die Suche umfasste dabei anfänglich sowohl Vertebraten als auch vor allem andere Invertebraten, wobei besonderes Augenmerk auf andere Insekten gelegt wurde, bei denen Spectral Tuning Sites bekannt sind. Die am interessantesten erscheinenden Taxa wurden anschließend aligniert (siehe Anhang, Abb.1 und Tab.3) und die bekannten Spectral Tuning Sites aus der Literatur mit dem eigenen Alignment abgeglichen, sodass die aus der Literatur stammenden Positionen zweifelsfrei identifiziert werden konnten. Abschließend wurden die Aminosäuren an Positionen, die bei Schmetterlingen dafür bekannt sind, einen Shift in den Rotbereich zu bewirken (Briscoe 2001) anhand ihrer biochemischen Eigenschaften näher betrachtet und mit den an den entsprechenden Positionen bei den Käfern auftretenden Aminosäuren verglichen, um zu prüfen, ob es sich bei den LW-Opsinen der Käfer um einen möglichen Rot-Rezeptoren handeln könnte.

2.2.2. CO1-Region

2.2.2.1. Versuchszeitraum, Versuchstiere

Die Versuche zur Sequenzierung der mitochondrialen CO1-Region (Cytochrome Oxidase Subunit 1) wurden von Mitte Juli bis Ende August 2010 durchgeführt. Hierbei wurden ebenfalls die Individuen *Pygo A*, *Pygo C* und *Eulasia E* verwendet. Die Beine der in Ethanol konservierten Körper wurden abgetrennt und zur DNA-Extraktion verwendet. Zusätzlich wurde die CO1-Region von drei weiteren Individuen (*Pygo B*: *Pygopleurus diffusus* Petrovitz, *Pygo D*: *Pygopleurus diffusus* Petrovitz und *Eulasia F*: *Eulasia pareyssei* Brullé) ermittelt. Individuum *Pygo B* stammt vom gleichen Fundort wie *Pygo A*, während *Pygo D* und *Eulasia F* von den gleichen Fundorten stammen wie Individuum *Pygo C* respektive *Eulasia E*. Auch diese drei weiteren Individuen wurden durch Dr. Guido Sabatinelli bestimmt. Für Fotos je eines Vertreters der analysierten Taxa siehe Abb.1.



Abb.1: Vertreter der untersuchten Taxa. Ganz links ein Vertreter der Art *Pygopleurus diffusus*, aus dem gleichen Fundgebiet wie die untersuchten Individuen *Pygo A* und *Pygo B*. In der Mitte ebenfalls ein Vertreter der Art *Pygopleurus diffusus* mit anderer Färbung, dessen Fundgebiet mit dem der Individuen *Pygo C* und *Pygo D* übereinstimmt. Ganz rechts zu sehen ein Vertreter der Art *Eulasia pareyssei*, Fundort identisch mit dem der Individuen *Eulasia E* und *Eulasia F*. Fotos: Martin Streinzer

2.2.2.2. DNA-Extraktion

Je 2-3 Beine wurden mit sterilem Skalpell und Pinzette abgetrennt und zur DNA-Extraktion verwendet. Diese wurde mit dem auf einem Silica-Membran-Säulchen-System basierenden „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen) durchgeführt. Die jeweils extrahierte Menge an genomischer DNA sowie der Verunreinigungsgrad wurden wiederum mit dem BioPhotometer 6131 (Eppendorf) vermessen.

2.2.2.3. Primer

Die CO1-spezifischen Primer *mtD8* (for; 5'-CCACATTTATTTTGATTTTTTGG-3') und *mtD12* (rev; 5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') wurden aus einer Arbeit von Dubitzky (2005) übernommen. Die erwartete Produktlänge dieses Primer-Sets lag bei etwa 850 bp. Die Synthetisierung der Primer erfolgte ebenfalls über die Firma VBC Biotech (Wien).

2.2.2.4. PCR, Aufreinigung, Sequenzierung

Der 20 µL Reaktionsansatz für die PCR beinhaltet folgende Komponenten:

2 µL	dNTPs (Fermentas)
2 µL	Puffer (Fermentas)
0.1 µL	Taq-Polymerase (Fermentas)
0.5 µL	Forward-Primer (<i>mtD8</i>)
0.5 µL	Reverse-Primer (<i>mtD12</i>)
0.2 µL	DNA
14.7 µL	H ₂ O

Bei dem verwendeten PCR-Temperaturprogramm mit dem realplex2 Mastercycler epgradientS (Eppendorf) handelte es sich um folgendes: 2 min. bei 95°C (Initialdenaturierung), gefolgt von 5 Zyklen mit 30 sec. bei 95°C (Denaturierung), je 1 Zyklus von 30 sec. bei 54/53/52/51/50°C (Annealing) und 45 sec. bei 72°C (Elongation) und danach 25 Zyklen mit 30 sec. bei 95°C (Denaturierung), 30 sec. bei 48°C (Annealing) und 45 sec. bei 72°C (Elongation).

Die einzelnen Banden wurden anschließend unter UV mit einem sterilen Skalpell aus dem Elektrophorese-Gel ausgeschnitten und mit dem „GeneJET Gel Extraction Kit“ (Fermentas) aufgereinigt. Die Sequenzierung erfolgte nach den gleichen Bedingungen wie in Kap.2.2.1.5 beschrieben, allerdings unterschied sich die Mengenzusammensetzung des Reaktionsansatzes geringfügig: 2 µl „BigDye Ready Reaction Mix“, 1 µl Sequenzierpuffer, 1 µl Primer, 1 µl Tween20 (1:100), 4 µl Template und 1 µl ddH₂O. Die Sequenzierung erfolgte jeweils sowohl in Forward- als auch in Reverse-Richtung.

2.2.2.5. Phylogenetische Analyse

Zuerst wurden die Sequenzen wiederum einem BLAST-Search unterzogen. Auch für die Analyse der CO1-Sequenzen aller 6 untersuchten Individuen (*Pygo A-D*, *Eulasia E-F*) wurde ein NJ-Baum errechnet. Weitere 15 Sequenzen anderer Käfer, deren „GeneBank Accession Numbers“ in Tab.4 aufgelistet sind, wurden in die Analyse miteinbezogen.

Tab.4: Die für die Erstellung des NJ-Baums herangezogenen Vergleichssequenzen. Angeführt sind die jeweiligen Taxa, ihre systematische Zuordnung innerhalb der Coleoptera sowie deren jeweilige Genebank Accession Number

Taxon	Systematik	GeneBank Accession No.
<i>Onthophagus rorarius</i>	Scarabaeiformia,Scarabaeidae,Scarabaeinae	AY131929.1
<i>Anomala cantori voucher</i>	Scarabaeiformia,Scarabaeidae, Rutelinae	DQ524408.1
<i>Oniticellus fulvus</i>	Scarabaeiformia,Scarabaeidae,Scarabaeinae	AY131910.1
<i>Eulasia sp.</i>	Scarabaeiformia, Glaphyridae	EU084039.1
<i>Milichus apicalis</i>	Scarabaeiformia,Scarabaeidae,Scarabaeinae	AY131921.1
<i>Alissonotum simile voucher</i>	Scarabaeiformia,Scarabaeidae, Dynastinae	DQ524449.1
<i>Dropephylla ioptera voucher</i>	Staphyliniformia, Staphylinidae, Omaliinae	DQ155920.1
<i>Liatongus militaris</i>	Scarabaeiformia,Scarabaeidae,Scarabaeinae	AY131908.1
<i>Proagoderus sappharinus</i>	Scarabaeiformia,Scarabaeidae,Scarabaeinae	EF188223.1
<i>Tribolium castaneum</i>	Cucujiformia, Tenebrionidae	EU048277.1
<i>Philonthus alpinus</i>	Staphyliniformia, Staphylinidae, Staphylininae	HM063429.1
<i>Xenopygus analis voucher</i>	Staphyliniformia, Staphylinidae, Staphylininae	GU377404.1
<i>Eubrianax edwardsii</i>	Elateriformia, Byrrhoidea, Psephenidae	EU713556.1
<i>Pyrochroa coccinea</i>	Cucujiformia, Pyrochroidae	DQ222023.1
<i>Hypotyphlus navaricus</i>	Caraboidea, Carabidae, Trechinae, Trechitae, Bembidiini	HM009030.1

Bei allen berücksichtigten Taxa handelt es sich um Vertreter der UO. Polyphaga, mit Ausnahme der Außengruppe *Hypotyphlus navaricus* (UO. Adephaga). Sämtliche Sequenzen wurden auf Nukleotidebene mit dem Programm „MEGA 4“ aligniert und daraus ein NJ-Baum (Complete Deletion, 1000 Replikate, Bootstrap-Support > 50%, Außengruppe *Hypotyphlus navaricus*) erstellt.

2.3. Ergebnisse

2.3.1. Opsin-Gen-Sequenzierung

2.3.1.1. Langwellen-Opsin-Charakterisierung

Die erfolgreiche Primerkombination *Beetle LW2 f* + *Beetle LW6 r* lieferte ein Fragment von 403 bp bei den Individuen *Pygo A* und *Eulasia E* sowie von 356 bp bei Individuum *Pygo C*. Versuche, mit dem anschließenden Design von sequenzspezifischen Primern die vorderen Gen-Abschnitte oder das 3'-Ende zu amplifizieren, blieben erfolglos.

Das gewonnene Gen-Fragment deckte die Positionen 604 (bei allen 3 Individuen) bis 959 (Individuum *Pygo C*) bzw. 1006 (Individuen *Pygo A* und *Eulasia E*) der LW-Opsin mRNA von *Tribolium castaneum* auf Nukleotidebene ab. Für das Nukleotid-Alignment der drei gewonnenen Sequenzen siehe Abb.2. Zwischen den Sequenzen der Individuen *Pygo A* und *Pygo C* waren Variationen an 6 Positionen erkennbar, während es zwischen den Individuen *Pygo A* und *Eulasia E* 41 variable Positionen gab und *Pygo C* und *Eulasia E* an insgesamt 32 Positionen variierten. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Sequenz von Individuum *Pygo C* um ca. 50 bp kürzer ist als die der anderen beiden Käfer.

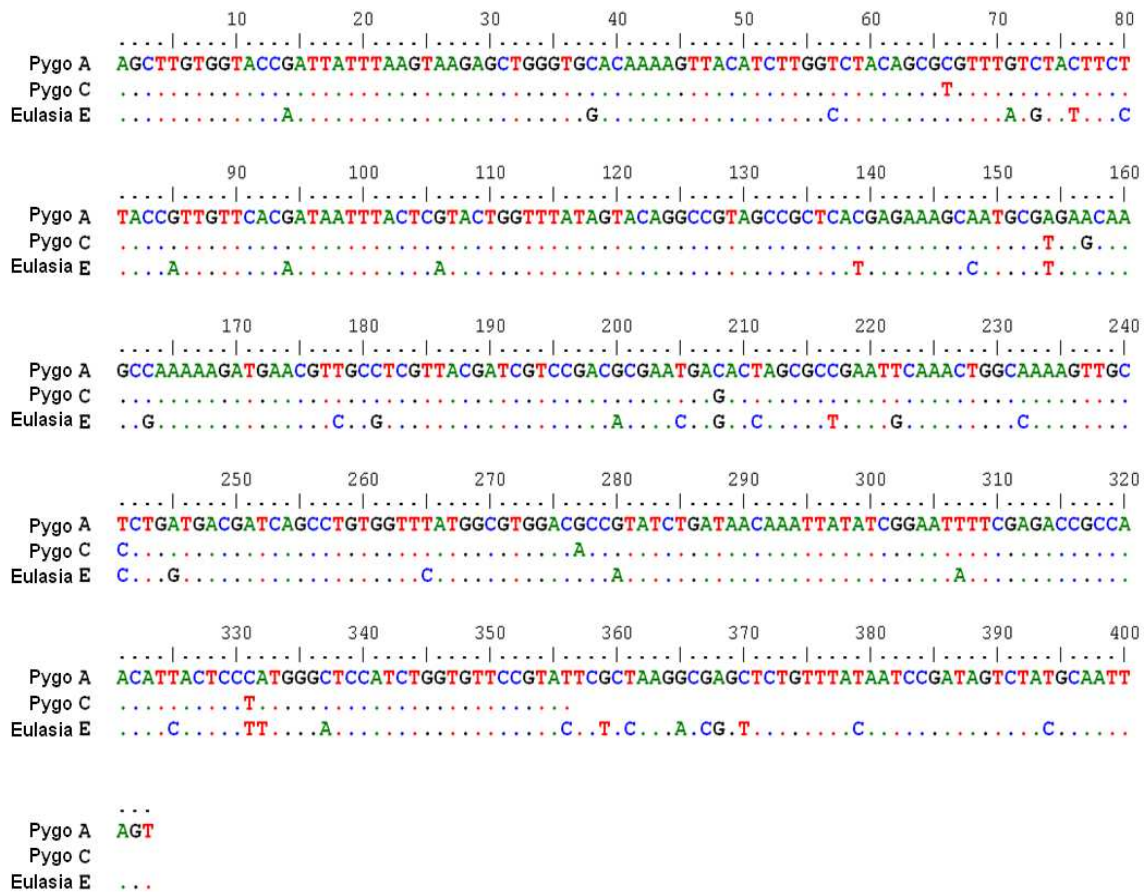


Abb.2: Alignment der Käfer-Sequenzen auf Nukleotidebene. Übereinstimmungen mit der als Vergleichssequenz herangezogenen Sequenz von Individuum *Pygo A* mit den jeweils anderen beiden Sequenzen sind als Punkte dargestellt, bei Unterschieden zur obersten Sequenz ist die jeweilige an der betreffenden Position auftretende Base angeführt.

Das Alignment der drei Sequenzen auf Ebene der Aminosäuren ist in Abb.3 dargestellt. Die obige Nukleotid-Sequenz kodierte insgesamt für 118 vollständige Aminosäuren bei Individuum *Pygo A* und für 134 Aminosäuren bei den Individuen *Pygo C* und *Eulasia E*.

Pygo A und *Pygo C* unterschieden sich dabei (Nummerierung immer auf Alignment in Abb.3 bezogen) an den Positionen A23V und D70E. Unterschiede zwischen den Individuen *Pygo A* und *Eulasia E* waren an den Positionen D6N, H14D, V20A, V25M, A68T, D70E, F75C, sowie M83V, M112L, F120L, A121S und A123T sowie S124G festzustellen. Die Individuen *Pygo C* und *Eulasia E* wiesen – zumindest im Deckungsbereich von *Pygo C* mit den anderen beiden Sequenzen – die gleichen Unterschiede auf wie die eben erwähnten zwischen *Pygo A* und *Eulasia E*, also an den Positionen 6, 14, 20, 25, 68, 70, 75, 83 sowie 112. An 2 Positionen allerdings gab es Abweichungen davon. An Position V23A gab es eine Variation, die zwischen den Individuen *Pygo A* und *Eulasia E* nicht auftrat. Auf der anderen Seite wiesen die

Individuen *Pygo C* und *Eulasia E* an der Position 70 beide ein E auf, während Individuum *Pygo A* hier ein D aufwies.

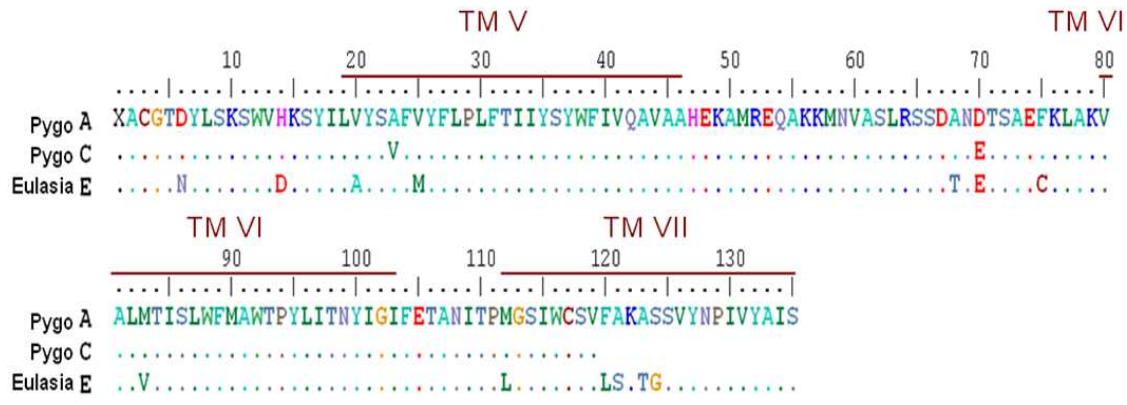


Abb.3: Alignment der Käfer-Sequenzen auf Aminosäureebene. Übereinstimmungen mit der als Vergleichssequenz herangezogenen Sequenz von Individuum *Pygo A* mit den jeweils anderen beiden Sequenzen sind als Punkte dargestellt, bei Unterschieden zur obersten Sequenz ist die jeweilige an der betreffenden Position auftretende Aminosäure angeführt. Das „X“ an der ersten Position steht für ein unvollständiges Triplet. Die dunkelroten Linien über dem Alignment kennzeichnen die Transmembrandomänen. Diese wurden durch ein Alignment mit der Sequenz von *Papilio glaucus* Rh3 nach Briscoe (2000) festgelegt. Die Transmembrandomänen I bis IV befinden sich vor dem vorliegenden Sequenzabschnitt.

Bei Betrachtung der Aminosäure-Substitutionen nach den Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren (siehe Anhang, Tab.2) ergaben sich sowohl zwischen den Individuen *Pygo A* und *Eulasia E* als auch zwischen *Pygo C* und *Eulasia E* jeweils 11 Substitutionen, bei denen sich die Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren unterschieden. Interessant erschien vor allem der Austausch zwischen polaren und unpolaren Aminosäuren, was an jeweils 7 Positionen (25, 68, 83, 112, 121, 123, 124) stattfand, von denen sich alle bis auf Position 68 in einem der Transmembranbereiche befanden. Eine Substitution von einer Aminosäure mit einer positiv geladenen Seitenkette (*Pygo A* und *Pygo C*) auf eine Aminosäure mit negativ geladener Seitenkette (*Eulasia E*) fand an Position 14 – außerhalb der Transmembranbereiche – statt (Abb.3).

Was die Zahl der synonymen Substitutionen betrifft, so fanden sich 5 zwischen den Individuen *Pygo A* und *Pygo C*, während zwischen *Pygo A* und *Eulasia E* 25 auftraten. Die Anzahl der synonymen Substitutionen zwischen *Pygo C* und *Eulasia E* schließlich belief sich auf 20.

2.3.1.2. Phylogenie der untersuchten Insekten-Opsine

Die Opsin-Sequenzen der drei untersuchten Käfer fielen in den Langwellen-Cluster der analysierten Insekten-Taxa (Abb.4), was sich auch mit den Ergebnissen der vorangegangenen BLAST-Suche deckte. Es hat sich auch gezeigt, dass die drei in der eigenen Analyse untersuchten Käfer einen eigenen Cluster innerhalb des LW-Clusters bildeten und somit, mit Ausnahme von Rh6 von *Drosophila melanogaster* sowie LW2 von *Apis mellifera*, abgesetzt von den anderen Taxa waren. Allerdings ergab sich vor allem vom LW-Cluster ein schlechter Bootstrap-Support. Äste mit Bootstrap-Support < 50% führten zur Kollabierung dieser Äste – dies geschah interessanterweise bei den 3 Käfern *Tribolium*, *Thermonectus* und *Luciola*, sowie bei *Sphodromantis*, Rh4 von *Papilio* oder LW1 von *Apis*. Innerhalb des Clusters der drei eigenen Sequenzen zeigte sich ein näheres Verwandtschaftsverhältnis zwischen den Individuen *Pygo A* und *Pygo C* als zwischen diesen beiden Individuen und *Eulasia E*.

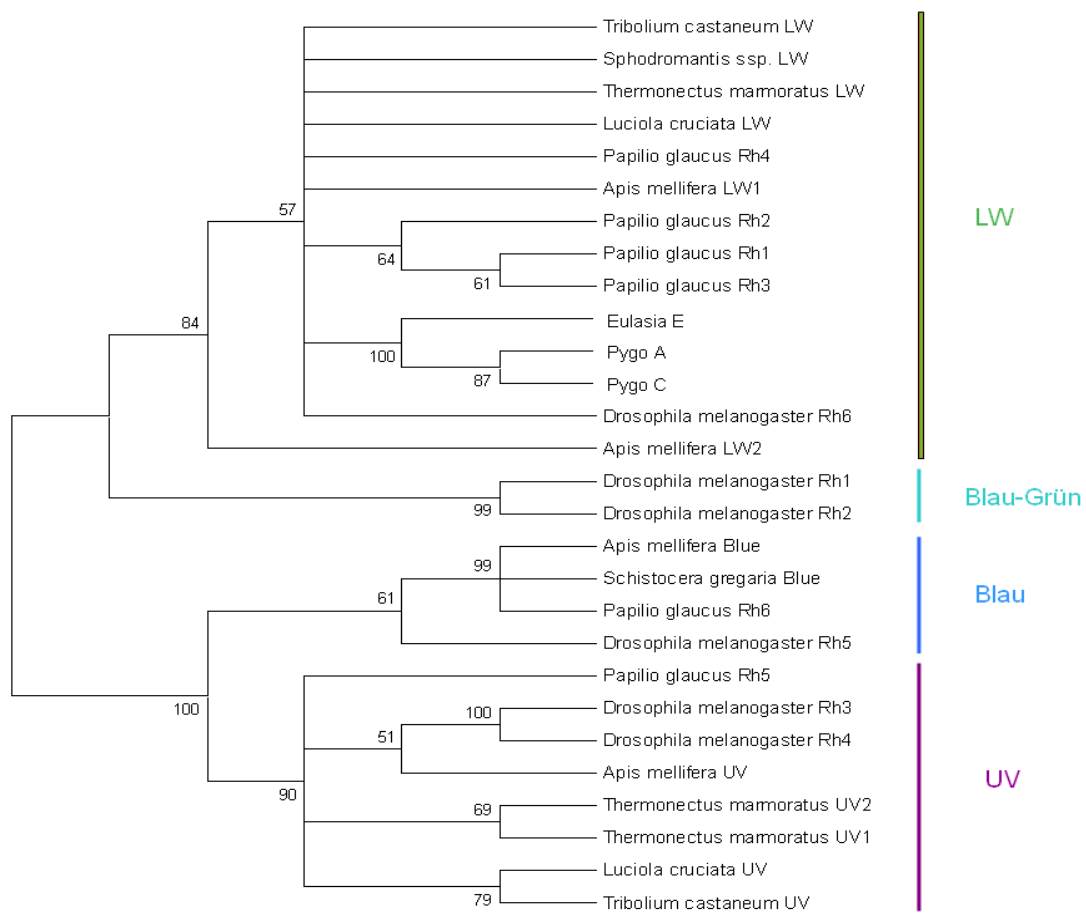


Abb.4: Phylogenie der Insekten-Opsine. Die dargestellte Phylogenie basiert auf einem Bootstrap Consensus-Baum, beruhend auf 1000 Replikaten des Neighbour-Joining (NJ) Algorithmus. Bootstrap-Werte sind in Prozent angegeben. Die Analyse wurde auf Bootstrap-Werte mit > 50% beschränkt, wodurch die Äste mit niedrigeren Bootstrap-Werten kollabierten. Die Spektralbereiche der einzelnen Opsine sind in farbigen Balken dargestellt.

Abb.5 zeigt das 3D-Modell der Kristallstruktur des Rhodopsins von *Loligo forbesi*. Darauf geplottet sind die variablen Positionen zwischen den 3 erhaltenen Käfersequenzen.

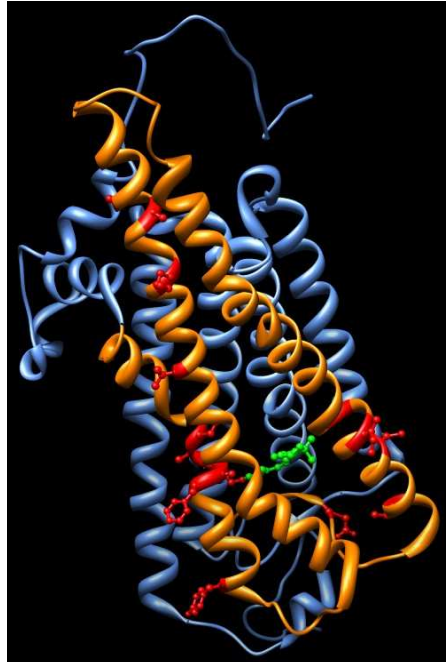


Abb.5: Schleifenstruktur des 3D-Modells der Langwellen-Opsine der Individuen *Pygo A*, *Pygo C* und *Eulasia E*. Homologiemodell mit dem Rhodopsin von *Loligo forbesi* als Template. In blau dargestellt ist das *Loligo*-Template, orange Bereiche kennzeichnen den Deckungsbereich zwischen *Loligo* und der längsten erhaltenen Käfersequenz. Der grüne Bereich stellt das Chromophor dar, während die roten Abschnitte variable Positionen zwischen den einzelnen Käfersequenzen andeuten.

2.3.1.3. Spectral Tuning Sites

Nach eingehender Literaturrecherche haben sich bekannte Spectral Tuning Positionen bei Schmetterlingen als am interessantesten für den Vergleich mit den eigenen Sequenzen erwiesen. Deshalb wird an dieser Stelle auch nur auf diesen Vergleich näher eingegangen. Vor allem Briscoe (2001) lieferte einen interessanten Vergleichspunkt für die eigene Analyse. In ihrer Arbeit nämlich verglich sie einerseits Aminosäure-Substitutionen zwischen *Papilio glaucus* Rh1 (Grün) und *Papilio glaucus* Rh3 (Rot), die einen Shift in den längerwelligen Bereich bewirkt haben könnten. Andererseits unternahm sie auch den Versuch, Positionen abzugleichen, die für den Rot-Shift bei *Heliconius* verantwortlich sein könnten. Das eigens erstellte Alignment findet sich im Anhang, Abb.1, die GeneBank Accession Numbers finden sich ebenfalls im Anhang, Tab.3.

Tab.5: Mit Verschiebungen der spektralen Empfindlichkeiten assoziierte Aminosäure-Substitutionen. Sämtliche hier untersuchten Positionen beziehen sich auf Briscoe (2001). In der ersten Spalte sind die von Briscoe angegebenen Positionen angeführt, die homologe Position des Bovine Rhodopsins bezieht sich auf eine Sequenz von Neri et al. (2010). Das eigens erstellte Alignment findet sich im Anhang, Abb.1. Node 18 bezieht sich auf Abb.3 aus Briscoe (2001). Angeführt sind jeweils die an den einzelnen Positionen auftretenden Aminosäuren sowie deren Eigenschaften laut Lehninger et al. (1998). Ein „-“, bezeichnet Unterschiede in der Opsin-Länge zwischen den einzelnen Sequenzen, „X“ bezeichnet Positionen, die bei den einzelnen Taxa nicht untersucht wurden. Die Abkürzungen A, B und C bezeichnen die Käfer *Pygo A*, *Pygo C* respektive *Eulasia E*.

Briscoe (2001)	Bovine	Eigenes Alignment	Papilio Rh1 (530 nm)		Papilio Rh3 (575 nm)		Beetle A, C, E		Heliconius (550 nm)		Node 18 (530 nm)	
			AS	Eigenschaft	AS	Eigenschaft	AS	Eigenschaft	AS	Eigenschaft	AS	Eigenschaft
160	186	210	A	Unpolar, aliphatische Seitenkette	V	Unpolar, aliphatische Seitenkette	A	Unpolar, aliphatische Seitenkette	X		X	
166	192	216	L	Unpolar, aliphatische Seitenkette	L	Unpolar, aliphatische Seitenkette	L	Unpolar, aliphatische Seitenkette	F	Aromatische Seitenkette	L	Unpolar, aliphatische Seitenkette
167	193	217	N	Polar, ungeladene Seitenkette	S	Polar, ungeladene Seitenkette	S	Polar, ungeladene Seitenkette	X		X	
168	194	218	K	Positiv geladene Seitenkette	K	Positiv geladene Seitenkette	K	Positiv geladene Seitenkette	Q	Polar, ungeladene Seitenkette	K	Positiv geladene Seitenkette
170	196	220	W	Aromatische Seitenkette	M	Polar, ungeladene Seitenkette	W	Aromatische Seitenkette	F	Aromatische Seitenkette	W	Aromatische Seitenkette
171	197	221	F	Aromatische Seitenkette	L	Unpolar, aliphatische Seitenkette	V	Unpolar, aliphatische Seitenkette	S	Polar, ungeladene Seitenkette	F	Aromatische Seitenkette
177	205	229	V	Unpolar, aliphatische Seitenkette	I	Unpolar, aliphatische Seitenkette	L	Unpolar, aliphatische Seitenkette	X		X	
178	206	230	A	Unpolar, aliphatische Seitenkette	A	Unpolar, aliphatische Seitenkette	V/A	Unpolar, aliphatische Seitenkette	L	Unpolar, aliphatische Seitenkette	I	Unpolar, aliphatische Seitenkette
181	209	233	I	Unpolar, aliphatische Seitenkette	V	Unpolar, aliphatische Seitenkette	A/V	Unpolar, aliphatische Seitenkette	X		X	
182	210	234	F	Aromatische Seitenkette	F	Aromatische Seitenkette	F	Aromatische Seitenkette	A	Unpolar, aliphatische Seitenkette	F	Aromatische Seitenkette
185	213	237	F	Aromatische Seitenkette	F	Aromatische Seitenkette	F	Aromatische Seitenkette	Y	Aromatische Seitenkette	F	Aromatische Seitenkette
186	214	238	T	Polar, ungeladene Seitenkette	L	Unpolar, aliphatische Seitenkette	L	Unpolar, aliphatische Seitenkette	A	Unpolar, aliphatische Seitenkette	S	Polar, ungeladene Seitenkette
189	217	241	A	Unpolar, aliphatische Seitenkette	G	Unpolar, aliphatische Seitenkette	F	Aromatische Seitenkette	X		X	
196	224	248	F	Aromatische Seitenkette	W	Aromatische Seitenkette	W	Aromatische Seitenkette	X		X	
225	-	277	E	Negativ geladene Seitenkette	D	Negativ geladene Seitenkette	D	Negativ geladene Seitenkette	X		X	
259	274	312	T	Polar, ungeladene Seitenkette	A	Unpolar, aliphatische Seitenkette	I	Unpolar, aliphatische Seitenkette	X		X	
261	276	314	I	Unpolar, aliphatische Seitenkette	V	Unpolar, aliphatische Seitenkette	I	Unpolar, aliphatische Seitenkette	X		X	
263	278	316	-		-		-		K	Positiv geladene Seitenkette	E	Negativ geladene Seitenkette
265	280	318	T	Polar, ungeladene Seitenkette	T	Polar, ungeladene Seitenkette	T	Polar, ungeladene Seitenkette	M	Polar, ungeladene Seitenkette	A	Unpolar, aliphatische Seitenkette
266	282	320	T	Polar, ungeladene Seitenkette	P	Unpolar, aliphatische Seitenkette	N	Polar, ungeladene Seitenkette	X		X	
270	286	324	L	Unpolar, aliphatische Seitenkette	V	Unpolar, aliphatische Seitenkette	M/L	M: Polar, ungeladene Seitenkette L: Unpolar, aliphatische Seitenkette	X		X	
271	287	325	G	Unpolar, aliphatische Seitenkette	S	Polar, ungeladene Seitenkette	G	Unpolar, aliphatische Seitenkette	X		X	

Tab.5 zeigt einen Vergleich der von Briscoe (2001) als Spectral Tuning Sites genannten Positionen, die sich mit dem vorhandenen Abschnitt der eigenen Käfer-Sequenzen decken. Es zeigte sich, dass den Rot-Shifts von einerseits *Papilio* und andererseits *Heliconius* unterschiedliche Mechanismen bzw. andere Tuning Sites zugrunde liegen könnten. Betrachtet man nämlich die Aminosäuren und ihre Eigenschaften an den

Positionen, die bei beiden Taxa in die Analyse miteinbezogen wurden, so zeigt sich, dass *Papilio* Rh3 mehr Gemeinsamkeiten mit dem kürzerwelligen Node 18 aufzuweisen scheint, als mit *Heliconius*, zumindest in dem analysierten Abschnitt.

Betrachtet man die Eigenschaften der Aminosäuren etwas genauer, so zeigte sich, dass die Käfer-Sequenzen sich diesbezüglich an einer Position (189; Nummerierungen nehmen Bezug auf Briscoe 2001) von den beiden mitberücksichtigten *Papilio*-Opsinen Rh1 und Rh3 unterschieden, wo anstelle einer unpolaren Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette bei den Käfern eine Aminosäure mit aromatischer Seitenkette zu finden war. An drei Positionen (170, 266, 271) unterschieden sich die Eigenschaften der Aminosäuren der Käfer an den jeweiligen Positionen von denen bei Rh3, deckten sich aber mit Rh1. An ebenfalls 3 Positionen (171, 186, 259) hatten die Aminosäuren der Käfer die gleichen Eigenschaften wie die bei Rh3, unterschieden sich aber von denen bei Rh1. Besonders Position 259 scheint dabei insofern interessant, da hier sowohl in *Papilio* Rh3 als auch in der Linie von 510 nm bei *Precis* nach 530 nm bei *Vanessa* eine Substitution einer polaren Aminosäure (S bzw. T) durch eine unpolare Aminosäure (A) stattfand (Briscoe 2001) und vermutlich einen Shift in den längerwelligen Bereich bewirkte. Homolog fand sich auch bei den Käfern an dieser Position eine unpolare Aminosäure.

Ebenfalls von Interesse erscheint auf den ersten Blick auch Position 185, die sowohl beim Menschen als auch bei Neuweltaffen homolog der Position 229 ist, wo eine F229I Substitution einen Shift von 2 nm in Richtung des LW-Bereichs bewirken soll (Shyue et al. 1998). Auch mit Shifts in Richtung des kürzerwelligen Bereichs in LW-Opsinen bei Krebsen wurden Parallelsubstitutionen an dieser Position in Verbindung gebracht (Crandall & Cronin 1997). Bei *Heliconius* fand eine F185Y Substitution an dieser Position statt (Briscoe 2001). Bei den untersuchten Käfern allerdings sowie auch bei *Papilio* Rh3 fand sich an dieser Position ein F.

2.3.2. CO1-Region

Die Sequenzierung der CO1-Region lieferte ein in etwa zwischen 785 und 815 bp langes Fragment bei allen 6 zur Analyse herangezogenen Individuen. Für die Alignments auf Nukleotid- bzw. Aminosäureebene siehe Anhang, Abb.2 respektive Abb.3.

Sowohl diese Alignments als auch der NJ-Baum (Abb.6) zeigten eine deutliche Aufspaltung zwischen den Individuen *Pygo A-D* einerseits, und den Individuen *Eulasia E-F* andererseits. Bei näherer Betrachtung von *Pygo A-D* schien *Pygo A* weniger nahe verwandt mit den anderen drei Individuen als diese untereinander. Am nächsten verwandt schienen die Individuen *Pygo B* und *Pygo D*. Nicht überraschend bildeten alle 6 untersuchten Käfer einen eigenen Cluster mit *Eulasia* sp..

Dadurch, dass der Schnitt bei Bootstrap-Werten von > 50% angesetzt wurde, ergab sich eine Kollabierung der meisten Äste. Einzig der Cluster mit den Glaphyriden sowie der Staphyliniformia-Cluster schienen einigermaßen gut abgesichert zu sein. Auch die beiden Scarabaeiformes *Milichus* und *Liatongus* wiesen ausreichenden Bootstrap-Support auf.

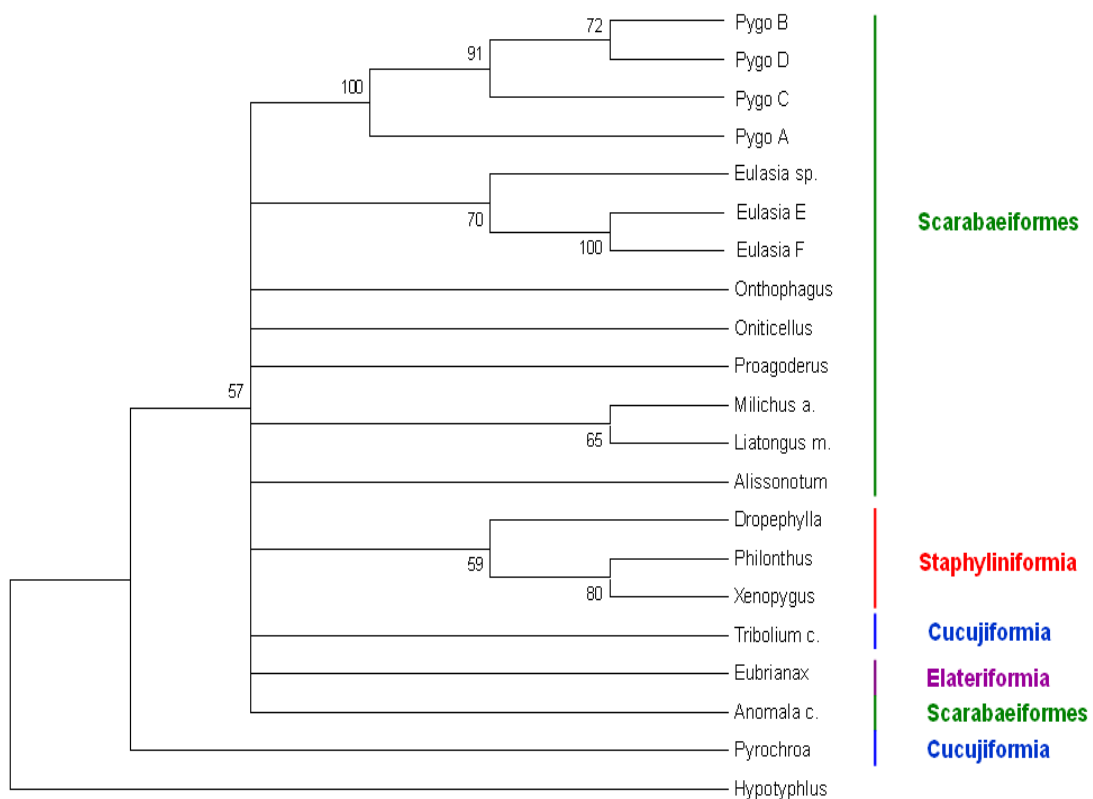


Abb.6: Phylogenie der untersuchten Insekten anhand der CO1-Region. Die dargestellte Phylogenie basiert auf einem Bootstrap Consensus-Baum, beruhend auf 1000 Replikaten des Neighbour-Joining (NJ) Algorithmus. Als Außengruppe diente *Hypotyphlus navaricus*. Bootstrap-Werte sind in Prozent angegeben. Die Analyse wurde auf Bootstrap-Werte mit > 50% beschränkt, wodurch die Äste mit niedrigeren Bootstrap-Werten kollabierten. Färbige Balken markieren die Zugehörigkeit zu einzelnen Teilordnungen der Coleoptera.

2.4. Diskussion

2.4.1. Opsin-Gen-Sequenzierung

2.4.1.1. Langwellen-Opsin-Charakterisierung

In der vorliegenden Arbeit habe ich die ersten Opsin-Gen-Sequenzen vermutlich rotsehender Käfer der Familie Glaphyridae präsentiert. Versuche zur molekularen Charakterisierung eines Langwellen-Opsin-Gens bei *Pygopleurus diffusus* sowie *Eulasia pareyssei* lieferten ein etwa 400 bp langes Fragment von einem Individuum von *Pygopleurus diffusus* (**Pygo A**) sowie von *Eulasia pareyssei* (**Eulasia E**) und ein etwa 360 bp langes Fragment eines weiteren *Pygopleurus diffusus* Individuums (**Pygo C**). Versuche zur Amplifizierung weiter 5' liegender Gen-Abschnitte sowie des 3'-Endes blieben allerdings erfolglos.

Sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäure-Ebene unterschied sich die Sequenz von Individuum **Eulasia E** weit deutlicher von **Pygo A** und **Pygo C** als diese beiden untereinander. Da es sich bei sowohl Individuum **Pygo A** als auch **Pygo C** um Vertreter der Gattung *Pygopleurus* handelt und bei Individuum **Eulasia E** um einen Vertreter der Gattung *Eulasia*, stellt sich dieses Ergebnis als wenig überraschend dar. Synonyme Substitutionen fanden ebenfalls vergleichsweise häufiger zwischen **Eulasia E** auf der einen und **Pygo A/ Pygo C** auf der anderen Seite, als zwischen **Pygo A** und **Pygo C** selbst statt.

Wenn man nur die Aminosäure-Substitutionen berücksichtigt, an denen ein Austausch zwischen polaren und unpolaren Aminosäuren zwischen den drei Sequenzen stattfand, so fanden zwischen den Individuen **Pygo A** und **Pygo C** keinerlei solcher Substitutionen statt, während zwischen **Pygo A** und **Eulasia E** an 7 Positionen (25, 68, 83, 112, 121, 123,124) derartige Substitutionen zu finden sind, und zwar an Positionen, von denen alle mit Ausnahme von Position 68 in einem der Transmembranbereiche liegen. Zwischen den Individuen **Pygo C** und **Eulasia E** fanden an den Positionen 25, 68, 83 und 112 solche Substitutionen statt, nach Position 119 endete die Sequenz von Individuum **C** allerdings.

Auch eine Substitution zwischen Aminosäuren mit unterschiedlich geladenen Seitenketten (positiv bzw. negativ) trat auf. Diese fand an Position 14, außerhalb der Transmembranbereiche, statt, und zwar sowohl zwischen den Individuen **Pygo A** und **Eulasia E** als auch zwischen **Pygo C** und **Eulasia E**.

Substitutionen zwischen Aminosäuren mit bzw. ohne Hydroxyl-Gruppe fanden zwischen *Pygo A* und *Pygo C* keine statt, zwischen *Pygo C* und *Eulasia E* eine (Position 68), während zwischen *Pygo A* und *Eulasia E* drei (68, 121, 123) solcher Substitutionen stattfanden. Bei allen Substitutionen wies Individuum *Eulasia E* die Aminosäure mit Hydroxyl-Gruppe auf. Zwei dieser Positionen (121, 123) liegen in einem der Transmembranbereiche.

Molekular charakterisierte LW-Opsin-Gene von Coleoptera sind bislang eher selten (Jackowska et al. 2007; Maksimovic et al. 2009; Oba & Kainuma 2009; Wu 2008). Deshalb können die hier gewonnenen Sequenzen hoffentlich wenigstens einen weiteren kleinen Beitrag zum besseren Verständnis dieser spektralen Klasse und überhaupt dem visuellen System der Coleoptera leisten, auch wenn es sich nur um Teilsequenzen handelt.

2.4.1.2. Phylogenie der untersuchten Insekten-Opsine

Die drei Käfer-Sequenzen fielen in der NJ-Analyse in den Langwellen-Cluster, was sich mit der vorangegangenen BLAST-Suche deckt. Es zeigte sich in dieser Analyse, wie zu erwarten war, dass die Opsinsequenz von Individuum *Eulasia E* weniger Übereinstimmung mit *Pygo A* und *Pygo C* zeigt als diese beiden untereinander.

Es bildeten sich zwei klar getrennte Cluster: zum einen „UV-“ und „Blau-Opsine“, die an einem Hauptast des Baums abzweigten, zum anderen die LW- und Blau-Grün-Opsine (Rh1 und Rh2 von *Drosophila melanogaster*) (Abb.4). Die Situation stellt sich also so dar, dass die Blau-Grün-Opsine von *Drosophila* näher mit den Langwellen- als den Blau- und UV-Opsinen verwandt sein dürften, was sich auch mit phylogenetischen Analysen anderer Autoren deckt (u.a. Briscoe et al. 2003; Hsu et al. 2001; Maksimovic et al 2009; Mardulyn & Cameron 1999). Allerdings war der Bootstrap-Support im LW-Cluster teilweise deutlich unter 50%. Interessant dabei ist, dass auch die drei Käfer *Tribolium*, *Luciola* und *Thermonectus* Werte unter 50% aufwiesen. Die Gründe für dieses Phänomen sind unklar.

2.4.1.3. Spectral Tuning Sites

Spectral Tuning übt einen bedeutenden Einfluss auf die Absorptionsmaxima bestimmter Opsine aus. Dennoch scheint nicht wirklich klar zu sein, ob diesem Phänomen in Vertebraten und Invertebraten die gleichen Mechanismen bzw. Positionen zugrunde

liegen. Die wenigen vergleichenden Untersuchungen zwischen Insekten und Vertebraten scheinen allerdings dahingehend zu weisen, dass sich sowohl die molekularen Grundlagen des Spectral Tuning als auch die verantwortlichen Positionen in beiden Gruppen grundlegend unterscheiden dürften (u.a. Briscoe 2000; Britt et al. 1993; Chang et al. 1995; Gärtner & Towner 1995).

So zeigte etwa der Vergleich zwischen bekannten Spectral Tuning Positionen von Vertebraten-Opsinen mit homologen Positionen in Schmetterlingen deutlich, dass sich bei diesen die grün- und rotempfindlichen Sehpigmente an den meisten dieser Positionen nicht voneinander unterscheiden (Briscoe 2000). Anstelle fand Briscoe (2001) andere mögliche Spectral Tuning Positionen in verschiedenen Schmetterlingstaxa. An drei dieser Positionen – 115, 139 und 142 (Nummerierung nach Briscoe 2001) – fanden Parallelsubstitutionen an zwei Ästen statt, die zu Rotsichtigkeit führten, nämlich bei *Heliconius sara* und dem duplizierten Opsin Rh3 in *Papilio*, während Aminosäure-Positionen (180, 197, 277, 285, 308: Nummerierungen bezogen auf *Homo sapiens*), welche bei Vertebraten für den Unterschied zwischen rot- und grünempfindlichen Sehpigmenten verantwortlich sind, bei Insekten wohl keine Rolle bei der Diversifizierung zwischen Rot- und Grünsichtigkeit spielen dürften, da sie in Rh1 und Rh3 von *Papilio* identisch sind, sodass bei Insekten tatsächlich andere Positionen für den Unterschied verantwortlich sein müssen (Briscoe 2000).

Des Weiteren war keine der gefundenen Substitutionen in *Heliconius* homolog zu denen, die für Shifts im Langwellen-Bereich bei Krebsen, *Homo sapiens* oder Neuweltaffen verantwortlich sind (Hsu et al. 2001). Auf dem Zweig, der zum in den Rotbereich verschobenen *Heliconius*-Opsin führte, fand an Position 185 (Nummerierung bezogen auf *Heliconius*) eine F zu Y Substitution statt (Briscoe 2001). Diese Position entspricht Position 229 in Neuweltaffen, wo eine F zu I Substitution einen 2 nm Rot-Shift verursacht (Shyue et al. 1998). Auch bei Krebsen scheint diese Position im Spectral Tuning eine bedeutende Rolle zu spielen (Crandall & Cronin 1997). Diese Position spielte in den eigenen Analysen allerdings keine Rolle. Derartige Vergleiche zwischen Vertebraten und Invertebraten können sich allerdings dahingehend als problematisch erweisen, da sich die Opsine von Invertebraten sowohl strukturell als auch funktionell in mehreren Aspekten von denen der Vertebraten unterscheiden (u.a. Britt et al. 1993; Townson et al. 1998).

Unabhängig von der eben erwähnten Position, die sowohl bei *Heliconius* als auch in Vertebraten oder anderen Arthropoden eine Rolle zu spielen scheint, sind für den Rot-Shift bei *Heliconius* und *Papilio* Rh3 noch weitere Positionen von Bedeutung, wie etwa 70, 94 und 97 (Nummerierung bezogen auf die beiden Schmetterlinge und entsprechen den Positionen 115, 139 respektive 142 in Briscoe 2002), die bei Vertebraten dagegen keine Rolle zu spielen scheinen (Briscoe 2001). Besonders Position 94 scheint von Bedeutung zu sein, da diese sehr nahe am Chromophor liegt und beide Linien hier eine F (Phenylalanin) zu Y (Tyrosin) Substitution aufweisen. Diese Substitution einer Aminosäure ohne Hydroxyl-Seitengruppe (F) durch eine Aminosäure mit Hydroxyl-Seitengruppe (Y) wurde auch bei Vertebraten ein Spectral Tuning-Effekt zugesprochen (Briscoe 2001).

Andere Daten wiederum scheinen doch darauf hinzuweisen, dass es zumindest gewisse Parallelen zwischen verschiedenen phylogenetischen Gruppen geben könnte. Salcedo et al. (2009) etwa wiesen eine Aminosäure-Substitution in Rh6, dem LW-Opsin, sowie Rh5, einem Blau-Opsin, von *Drosophila melanogaster* an einer Position nach, die der Position 292 im Bovine Rhodopsin entspricht und sowohl in Vertebraten als auch in *Drosophila* Einfluss auf Spectral Tuning ausübt. Mutagenese-Experimente an dieser Position haben gezeigt, dass A292S- oder S292A-Mutanten beträchtliche Blau- (bei Tiefseefischen, u.a. Hunt et al. 1996, 2001) respektive Rot-Shifts (etwa bei Mäusen, Quastenflossern oder Meeressäugern) aufweisen (u.a. Fasick & Robinson 1998; Lin et al. 1998; Sun et al. 1997; Takahashi & Ebrey 2003; Yokoyama et al. 1999). Salcedo et al. (2009) führten mit *Drosophila* an der entsprechenden Position (Position 315 in *Drosophila*) ebenfalls Mutagenese-Experimente durch und fanden auch hier beträchtliche Shifts. Diese Position scheint bei anderen Insekten – unter anderem auch bei den untersuchten Käfern – allerdings keine Rolle beim Spectral Tuning zu spielen. Briscoe (2001) maß dieser Position bezüglich der Grün-Rot-Differenzierung bei Schmetterlingen keine Bedeutung zu, da sowohl *Papilio* Rh1 als auch Rh3 an dieser Position (entspricht Position 330 im eigenen Alignment, Anhang Abb.1) ein S aufweisen, was auch bei allen drei untersuchten Käfern der Fall ist.

Spaethe & Briscoe (2004) fanden in Hymenopteren 5 Positionen – 94, 97, 138, 185 und 186 (Nummerierung wie in Briscoe 2001) –, die homolog zu bekannten Spectral Tuning Positionen beim Menschen, bei Neuweltaffen, Krebsen oder anderen Insekten sind. Die Positionen 94 und 97 haben Auswirkungen auf Spectral Tuning bei Schmetterlingen

(Briscoe 2001), Krebsen (Crandall & Cronin 1997) und Bienen (Briscoe 2002). F185Y-Substitutionen, die Spaethe & Briscoe (2004) ebenfalls vorfanden, verursachen bei Schmetterlingen und Krebsen einen Rot-Shift (Briscoe 2001; Crandall & Cronin 1997). Bei Neuweltaffen dagegen verursacht eine I229F-Substitution (die homologe Position zu Position 185) einen Blau-Shift (Shyue et al. 1998).

Von diesen 5 Positionen waren nur die letzten beiden für die eigene Analyse relevant, da die anderen 3 Positionen vor dem gefundenen Sequenz-Abschnitt der Käfer liegen. Position 185 (entspricht Position 237 im eigenen Alignment, Anhang Abb.1) scheint zwar bei *Heliconius* einen Anteil am Rot-Shift zu haben, da ebenfalls eine F185Y-Substitution vorhanden ist, dagegen scheint diese Position bei *Papilio* keine Rolle zu spielen, da sowohl Rh1 als Rh3 ein F aufweisen (Briscoe 2001), was sich auch mit den drei untersuchten Käfern deckt. Position 186 (Position 238 im eigenen Alignment, Anhang Abb.1) gestaltete sich dabei schon als interessanter, da sowohl *Heliconius* als auch *Papilio* Rh3 an dieser Position eine unpolare Aminosäure aufweisen, genauso wie die drei Käfer, während *Papilio* Rh1 und Node 18 an dieser Stelle eine polare Aminosäure haben. Wenn man nur nach dieser Position ginge, könnte man spekulieren, dass die spektrale Empfindlichkeit des LW-Opsins bei den untersuchten Käfern durchaus ins Längerwellige verschoben sein könnte. Allerdings können durch nur eine einzige Substitution keine Aussagen bezüglich des spektralen Empfindlichkeitsbereiches getroffen werden. Mutagenese-Experimente an dieser Position mit einhergehenden elektrophysiologischen Untersuchungen wären notwendig.

Wie stellt sich die Situation aber nun bei Betrachtung der eigenen Käfer-Sequenzen genauer dar? Lassen sich aufgrund bestimmter Aminosäure-Substitutionen Aussagen darüber treffen, ob es sich bei den sequenzierten Opsin-Genen um Grün- oder Rot-Opsine handelt?

Ein seit längerer Zeit bekannter Mechanismus für Spectral Tuning ist der Ersatz einer Aminosäure in der bindenden Tasche durch eine andere Aminosäure mit unterschiedlicher Polarität (u.a. Asenjo et al. 1994; Neitz et al 1991; Yokoyama & Yokoyama 1990). Veränderungen der Polarität von Aminosäuren innerhalb der „Chromophor-bindenden Tasche“ des Opsins üben zum Beispiel einen Einfluss auf die Verteilung der Elektronen innerhalb des Chromophors aus und führen so zur Diversität der spektralen Empfindlichkeitsmaxima (Honig et al. 1976).

Betrachtet man die Aminosäure-Substitutionen an Positionen, die Briscoe (2001) als entscheidend für die Entstehung der Rotsichtigkeit bei *Papilio* bzw. *Heliconius* ansah, so ergaben sich 5 Positionen (186, 259, 266, 270, 271; Nummerierung nach Briscoe 2001), bei denen ein Austausch zwischen polaren und unpolaren Aminosäuren stattfand. Alle diese Positionen liegen in einem der Transmembranbereiche, mit Ausnahme von Position 266.

Es scheint so zu sein, dass Aminosäure-Positionen, die sich außerhalb der 7 Transmembranbereiche befinden, keinen oder zumindest keinen großen Einfluss auf Spectral Tuning ausüben (Chang et al. 1995; Nathans et al. 1986; Yokoyama & Yokoyama 1990; Yokoyama & Radlwimmer 1998). Aus diesem Grund hat Position 266 vermutlich keinen größeren Einfluss auf Spectral Tuning. Die anderen vier Positionen könnten demnach eine Rolle spielen. Allerdings sind ohne elektrophysiologische Untersuchungen oder Mutagenese-Experimente keine klaren Aussagen zu treffen, ob diese Positionen tatsächlich eine Rolle im Spectral Tuning spielen, da nicht wirklich geklärt ist, ob die untersuchten Käfer tatsächlich rot sehen. Für Einschätzungen bezüglich der Positionen 185 und 186 siehe weiter oben. Die durchgeführten Verhaltensversuche (siehe Kap. 3, Teil II) deuten zwar zumindest bei den untersuchten Vertretern von *Pygopleurus spec.* auf vorhandene Fähigkeit zur Rotsichtigkeit hin, aber ohne die erwähnten zusätzlichen Untersuchungsmethoden bleibt die Frage ungeklärt.

Positionen-spezifische Mutagenese-Experimente haben bei den rot- und grünempfindlichen Sehpigmenten der Vertebraten zahlreiche wichtige Erkenntnisse geliefert (u.a. Asenjo et al. 1994). Aufgrund solcher Mutagenese-Experimente sind die molekularbiologischen Hintergründe des Spectral Tuning bei Vertebraten heute weitgehend bekannt (Briscoe 2002). Auch im vorliegenden Fall könnten solche Experimente in Verbindung mit vorangehenden und nachfolgenden elektrophysiologischen Messungen klarere Aussagen ermöglichen.

Entscheidend scheinen auch Positionen zu sein, die nahe am Chromophor liegen und an denen je ein Austausch einer Aminosäure mit unpolaren Resten (im grünen Sehpigment) durch eine Aminosäure mit Hydroxyl-Gruppe (im roten Pigment) stattgefunden hat (Asenjo et al. 1994; Chan et al. 1992; Kleinschmidt & Harosi 1992; Merbs & Nathans 1992, 1993; Neitz et al. 1991; Yokoyama & Yokoyama 1990; Yokoyama & Radlwimmer 2001). Ausgehend von den von Briscoe (2001) untersuchten Positionen haben sich 5 Positionen (167, 186, 259, 266, 271; Nummerierung nach

Briscoe 2001) innerhalb der Transmembranbereiche ergeben, an denen ein solcher Austausch stattfand. Vier dieser Positionen decken sich mit denen, an denen ein Austausch zwischen polaren und unpolaren Aminosäuren stattfand. Allerdings scheint dieser Mechanismus nach den vorliegenden Ergebnissen zu urteilen auf Insekten – oder zumindest auf die untersuchten Taxa – nur bedingt zuzutreffen, da Aminosäuren mit OH-Gruppe an diesen Positionen teils auch in *Papilio Rh1* vorkommen, während *Papilio Rh3*, *Heliconius* oder die untersuchten Käfer keine Hydroxyl-Gruppe aufweisen. So weisen etwa an der bereits mehrfach erwähnten Position 186 sowohl *Papilio Rh1* als auch Node 18 polare Aminosäuren mit Hydroxyl-Gruppen auf, während die rotsichtigen Opsine von *Papilio Rh3* und *Heliconius* – wie auch die Käfer – eine unpolare Aminosäure an dieser Position haben. Klare Aussagen lassen sich also auch diesen Aspekt berücksichtigend nicht treffen.

Betrachtet man nur die Käfer-Sequenzen unter diesem eben genannten Gesichtspunkt des Austauschs von Aminosäuren mit bzw. ohne Hydroxyl-Gruppen, so fanden sich innerhalb der Transmembranbereiche zwei Substitutionen solcher Art zwischen den Individuen *Pygo A* und *Eulasia E*, bei denen in beiden Fällen die Aminosäure mit Hydroxyl-Gruppe bei Individuum *Eulasia E* – *Eulasia pareyssei* – auftrat. Es gibt mehrere mögliche Erklärungsansätze. Einerseits, wie gerade vorhin festgestellt, könnte es wahrscheinlich sein, dass dieser Mechanismus so in Invertebraten oder Insekten nicht funktioniert, dass also nicht zwangsweise das rote Sehpigment an entscheidenden Positionen die Aminosäuren mit Hydroxyl-Gruppe aufweisen muss. Andererseits könnte es natürlich auch sein, dass diese erwähnten Positionen überhaupt keinen Einfluss auf Spectral Tuning ausüben. Wiederum könnten hier nur Mutagenese-Experimente in Kombination mit elektrophysiologischer Datenerhebung aufschlussreiche Antworten liefern.

Ein weiterer Punkt könnte sein, dass *Eulasia pareyssei* eventuell tatsächlich einen Rot-Rezeptor besitzt. Bei einem weiteren Vertreter der Gattung *Eulasia* – *Eulasia pietschmanni* – wurde vor kurzem ein Rot-Rezeptor durch ERGs nachgewiesen (Martinez-Harms et al. unveröffentlicht). Dieser Gedanke scheint also gar nicht so abwegig zu sein. Andererseits haben eigene Farbfallenversuche (siehe Kap.3.3.4) ergeben, dass *Eulasia* keine ausgeprägte Präferenz für die Farbe Rot zu haben scheint, während *Pygopleurus* die Farbe Rot allen anderen Farben gegenüber bevorzugt. Diese Versuche haben sich auch mit persönlichen Beobachtungen gedeckt, dass *Eulasia*

vorwiegend auf gelben Blüten sitzen, während *Pygopleurus* bevorzugt auf den roten Blüten rasten und nach Partnern suchen. Aus dieser Tatsache heraus wäre eher zu erwarten, dass *Pygopleurus* einen Rot-Rezeptor aufweist als *Eulasia*. Ein erschwerender Faktor neben den fehlenden elektrophysiologischen Daten zu den untersuchten Käfern sowie dem Nichtvorliegen von Mutagenese-Daten ist auch die kurze Fragmentlänge des gefundenen Sequenzabschnitts der Käfer. Transmembranbereiche I-IV fehlen leider komplett. Dieser Punkt stellt insofern ein erschwerendes Hindernis dar, da viele der bekannten Spectral Tuning Positionen vor dem Sequenzabschnitt liegen, der in der eigenen Analyse zur Verfügung stand. Nur bei Abgleich aller – zumindest im Insektenreich – bekannten Spectral Tuning Positionen über das gesamte Gen hinweg wären zuverlässigere Aussagen möglich.

Auch sind zum Spectral Tuning bei Käfern bislang noch keine Daten vorhanden, sodass die entscheidenden Mechanismen und eventuell mögliche Spectral Tuning Positionen vollkommen unbekannt sind. Auch die vorliegende Studie kann leider nicht viel zur Klärung dieser Fragen beitragen, bietet aber vielleicht einen Ansatz- bzw. Ausgangspunkt, um in Zukunft in weiterführenden Studien die drei entscheidenden Komponenten zur Aufklärung der Mechanismen des Spectral Tuning zu kombinieren, nämlich elektrophysiologische Messungen, Opsin-Gen-Charakterisierung sowie Mutagenese-Experimente.

2.4.2. COI-Region

Von allen 6 in die Analyse miteinbezogenen Individuen konnte ein durchschnittlich etwa 800 bp langes Fragment sequenziert werden. Die NJ-Analyse ergab, dass alle 6 untersuchten Individuen (*Pygo A-D*, *Eulasia E-F*) am nächsten mit *Eulasia* sp. verwandt zu sein scheinen, zumindest bei Betrachtung des verwendeten Markers. Da es sich bei allen diesen Vertretern um Mitglieder der Familie Glaphyridae handelt, ist dieses Faktum nicht weiter überraschend. Ebenfalls nicht weiter überraschend ist die Tatsache, dass die Individuen *Eulasia E* und *Eulasia F* (beide *Eulasia pareyssei*) näher mit der Sequenz von *Eulasia* sp. clustern als *Pygo A-D* (*Pygopleurus diffusus*), da erstere zur gleichen Gattung gehören wie die vergleichende Sequenz aus der Gene Bank. Allerdings scheint es sich bei der Sequenz aus der Genbank einerseits und den eigenen beiden Individuen andererseits nicht um die gleiche Art zu handeln, oder mindestens um eine andere Unterart. Auffällig wenn man die Individuen *Pygo A-D*

betrachtet ist wiederum, dass die CO1 Sequenz von Individuum *Pygo A* sich deutlich von denen von Individuen *Pygo B-D* unterscheidet, obwohl laut Bestimmung durch Dr. Guido Sabatinelli alle 4 Individuen Vertreter der Art *Pygopleurus diffusus* sind. Erklären ließe sich dieses Faktum eventuell damit, dass es sich bei Individuum *Pygo A* um eine andere Unterart handeln könnte. Insgesamt wäre es möglich, dass es sich bei den Individuen *Pygo A-D* um mehrere verschiedene Unterarten handeln könnte, was die in der NJ-Analyse aufgetretenen Diskrepanzen und den teils niedrigen Bootstrap-Support erklären könnte.

Insgesamt ergaben sich teils sehr niedrige Bootstrap-Werte, sodass die durch die NJ-Analyse gewonnenen Verwandtschaftsbeziehungen mit Vorsicht zu betrachten sind. Versuche, bei der Datenauswertung nur Werte über 50% Bootstrap-Support zu berücksichtigen, führten zur Kollabierung des Baums. Da ein sehr breites taxonomisches Spektrum an Coleoptera in die Analyse miteinbezogen wurde – als Außengruppe wurde sogar ein Mitglied einer anderen Unterordnung verwendet – könnten die teils sehr niedrigen Bootstrap-Werte eventuell durch eine sehr hohe Sensibilität des Markers CO1 erklärbar sein. Einzig der Cluster der untersuchten Staphyliniformia schien neben den Glaphyridae noch einigermaßen gut abgesichert zu sein.

Dabei scheint die eindeutige Identifizierung einzelner Taxa gerade in Zeiten zunehmender Umweltproblematiken an immer größerer Bedeutung zu gewinnen, da diese für verschiedenste Biodiversitätsstudien oder Arterhaltungsmaßnahmen unerlässlich scheint. Allerdings ist die Identifizierung einzelner Taxa nicht nur zeitaufwändig, sondern setzt auch weitreichende Fachkenntnisse voraus (u.a. Hajibabaei et al. 2007; Monaghan et al. 2005; Raupach et al. 2010). Aus diesem Grund scheint der Einsatz molekularbiologischer Barcoding-Methoden ein vielversprechender Ansatz zu sein, mit wenig Zeitaufwand eine eindeutige Identifizierung der untersuchten Taxa zu gewährleisten (Hebert et al. 2003; Pereira et al. 2008; Waugh 2007).

Mitochondrielle Marker scheinen aufgrund ihrer Eigenschaften besonders geeignet für molekularbiologische Analysen zu sein, da sie fast ausschließlich maternal vererbt werden und hohe Substitutionsraten, dafür aber keine Rekombination aufweisen (Ballard & Whitlock 2004; Ballard & Rand 2005). Allerdings weisen mitochondriale im Vergleich zu nukleären Markern auch bestimmte Nachteile auf. So ist der Einsatz von Barcoding zum Beispiel darauf angewiesen, dass intraspezifisch nur geringe Variation

der mitochondrialen DNA vorliegt, während interspezifisch eine klare genetische Differenzierung vorliegen sollte, was allerdings keineswegs immer der Fall ist (Meyer & Paulay 2005; Raupach et al. 2010; Wiemers & Fiedler 2007). Ein weiteres Problem ergibt sich, wenn nukleäre mitochondrielle Pseudogene (Numts) mitamplifiziert werden (u.a. Hazkani-Covo et al. 2010; Pamilo et al. 2007; Song et al. 2008). Dennoch scheinen die Vorteile mitochondrieller Barcoding-Methoden die Nachteile zu überwiegen.

3. Teil II: Blütenpräferenz und Bestäubungsbiologie bei Käfern der Gattung *Pygopleurus* (Glaphyridae)

3.1. Einleitung

3.1.1. Blüten der Mohngilde und ihre Bestäuber

Im Mittelmeergebiet sind rote Blüten bei den Gattungen *Anemone*, *Papaver*, *Tulipa*, *Ranunculus*, *Glaucium* und *Adonis* häufiger vorzufinden, deren Hauptbestäuber Käfer der Familie Glaphyridae sind. Auffällig an diesen roten Blüten der Mittelmeerregion ist, dass sie keine UV-Reflexion aufweisen (s.o.). Im Gegensatz dazu weist z.B. *Papaver rhoeas* außerhalb des Mittelmeerraums durchaus UV-Reflexion auf, dort wird er allerdings von Bienen bestäubt (Dafni et al. 1990; Daumer 1958; Proctor & Yeo 1973). Die o.g. Pflanzenarten werden auch als „Mohngilde“ zusammengefasst, wegen ihres dunklen Blütenzentrums, das entweder durch die Staubgefäße selbst (*Anemone*, *Ranunculus*, *Adonis*) oder eine Färbung des Perianths (*Papaver*, *Tulipa*, *Glaucium*) gebildet werden kann. Weitere Gemeinsamkeiten sind ihr radiärsymmetrischer Blütenbau mit großen, schalen- oder becherförmigen Blüten und ihr – zumindest für den Menschen – nahezu fehlender Duft (Dafni et al. 1990).

Andere Arten dieser Pflanzengattungen haben außerhalb des Nahen Ostens und der Mittelmeerregion meist deutlich kleinere Blüten und weisen für gewöhnlich keine roten Blüten auf. Zusätzlich sind rote Blüten extrem selten im östlichen Mittelmeergebiet. Nur sechs Arten außer den Arten der „Mohngilde“ reflektieren im Rotbereich (Kesar et al. 2009; Menzel & Shmida 1993). Weiters stellten Dafni et al. (1990) fest, dass ein starker Schwarz-Rot-Kontrast, durch das dunkel gefärbte Blütenzentrum gebildet, die Blüten für die Käfer noch attraktiver macht. Im restlichen Europa fehlt dieses schwarze Zentrum dagegen zumeist.

Diese Beobachtungen deuten auf eine Co-Evolution zwischen Pflanzenarten der „Mohngilde“ und ihren Bestäubern aus der Familie der Glaphyridae im östlichen

Mittelmeergebiet hin. Das Hauptvorkommen von roten Blüten der „Mohngilde“ überschneidet sich dabei in dieser Region mit einem Diversitätszentrum der Gattungen *Eulasia* und *Pygopleurus* (= „Amphicoma“ *sensu* Dafni et al. 1990), die sich ausschließlich von Pollen ernähren und die Hauptbestäuber dieser Blüten sind (Dafni et al. 1990; Keasar et al. 2009). Alleine in der östlichen Mittelmeer-Region beläuft sich die Zahl der Vertreter der Glaphyridae auf 3 Gattungen mit insgesamt 45 Arten (Keasar et al. 2009).

Dafni et al. (1990) stellten fest, dass Käfer der Gattung *Amphicoma* rote, geruchslose Plastikbecher, die als Blütenmodelle verwendet wurden, allen andersfärbigen angebotenen Bechern deutlich vorzogen. Etwa 87 % der gefangenen Käfer fanden sich in den roten Bechern wieder, die restlichen 13 % waren mehr oder weniger gleichmäßig auf die anderen Farbmodelle (blau, gelb, grün, braun, weiß) verteilt. Die Wahl der Käfer für rote Blüten scheint dabei angeboren zu sein. Ein Informationsaustausch zwischen den Käfern scheint dabei keine Rolle zu spielen (Dafni 1997).

3.1.2. Blütenfarbpolymorphismus

Es stellt sich die Frage, welchen Einfluss die Blütenfarbe nun tatsächlich auf das Verhalten ihrer Bestäuber, in diesem Fall auf die untersuchten Vertreter der Glaphyridae, ausübt. Vorherige Beobachtungen ergaben, dass Arten der *Ranunculaceae* einen teils ausgeprägten Farbpolymorphismus aufweisen (u.a. Horovitz & Zohary 1966; Horovitz 1976). Horovitz (1976) sieht den Grund für den Farbpolymorphismus der Gattung *Anemone* in edaphischen Faktoren begründet.

Anemone pavonina etwa kann in Nord-Griechenland in den Morphen rot, lila und weiß – mit mehreren Zwischenstufen in rosa (= rot mit Blauanteil) – auftreten. Interessanterweise dürfte die rote Morphe eher in tieferen Lagen vorkommen und überwiegend von Käfern der Gattung *Pygopleurus* besucht werden, während die lila Morphe eher in höheren Lagen aufzutreten scheint und vorwiegend von Bienen besucht werden dürfte (persönliche Kommunikation Hannes Paulus & Johannes Spaethe).

Die Farbstoffe in den Blütenblättern von *Anemone coronaria* sind drei funktionelle Gruppen der Anthocyane, nämlich Pelargonidin, Delphinidin und Cyanidin (Harvey 1971; Saito et al. 2002; Toki et al. 2001). Anthocyane (gr.: *anthos* = Blume, *kianos* = blau) sind die wichtigsten Pigmente der Gefäßpflanzen. Diese Pigmente verursachen die orange, rosa, rote, violette oder blaue Färbung der Blüten und Früchte vieler Pflanzen.

Sie gehören zu einer weitverbreiteten Klasse von Phenolverbindungen, den Flavonoiden (Castañeda-Ovando et al. 2009; Kong et al. 2003). Anthocyan ändert je nach pH-Wert die Farbe. Bei pH-Wert 1 herrscht rote Farbe (Flavylium-Kation) vor und trägt zu roter oder violetter Färbung bei. Bei Werten zwischen 2 und 4 herrscht die chinonartige blaue Färbung vor, bei Werten zwischen 5 und 6 treten zwei farblose Verbindungen auf. Bei pH-Werten > 7 degradieren die Anthocyane in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Substituentengruppe. Bei basischeren pH-Werten steigt der Anteil der blauen Form, während bei säurereichen Verhältnissen die rote Form dominant ist (Castañeda-Ovando et al. 2009; Cooper-Driver 2001).

Farbpolymorphismus in Bezug auf unterschiedliche Blütenfarben scheint bei vielen Taxa verbreitet zu sein. Viele Autoren gehen davon aus, dass der Farbpolymorphismus durch die jeweiligen Bestäuber aufrechterhalten wird, da viele von ihnen deutliche Farbpräferenzen zeigen und oft Farbkonstanz aufweisen (Jones & Reithel 2001; Lack & Kay 1987; Stanton 1987). Aber auch Herbivore könnten einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung des Farbpolymorphismus ausüben (Irwin et al. 2003).

Auch weitere Faktoren könnten eine nicht zu unterschätzende Rolle spielen. So fanden etwa Schemske and Bierzychudek (2001), dass Niederschlagsmenge negativ korreliert ist mit Fortpflanzungserfolg bei der blauen Morphe von *Linanthus parryae* (Polemoniaceae), aber einen positiven Einfluss auf den Reproduktionserfolg der weißen Morphe ausübt. *Linanthus parryae* ist ein gut untersuchtes Beispiel für Farbpolymorphismus, ebenso wie die möglichen Erklärungsansätze für den Farbpolymorphismus innerhalb dieser Art enorm divers zu sein scheinen (u.a. Epling & Dobzhansky 1942; Schemske & Bierzychudek 2001, 2007; Wright 1943). Ein einziges Gen scheint die Blütenfarbe von *Linanthus* zu bestimmen, wobei die blaue im Vergleich zur weißen Morphe die dominante Form darstellt (Epling et al. 1960).

Auch andere Blütenpflanzen weisen teils ausgeprägten Farbpolymorphismus auf. Ein weiteres gut untersuchtes Beispiel ist etwa *Ipomoea purpurea*, die Purpur-Prunkwinde, welche pinke, blaue und weiße Morphen aufweist (u.a. Epperson & Clegg 1986, 1987). Die Farbverteilung zwischen blau und pink scheint durch nur einen einzigen Locus determiniert zu sein, während der Anteil der Pigmentierung der Kronblätter durch einen zweiten Locus bestimmt wird (Ennos & Clegg 1983). Vermutungen gehen dahin, dass die Verteilung des weißen Genotyps durch Selektion und Mutation festgelegt wird (Brown & Clegg 1984). Die weiße Morphe wird dabei am wenigsten häufig von

Hummeln, den wichtigsten Bestäubern der Pflanze, besucht und weist, wenn sie den anderen Morphen gegenüber in der Minderheit ist, geringere Auskreuzungsraten auf (Brown & Clegg 1984; Epperson & Clegg 1986, 1987).

Polymorphismus der Corollafärbung wird zumeist durch Mutationen an Loci ausgelöst, die die Pigmentsynthese regulieren. Beispiele dafür sind etwa *Anemone coronaria* (Horovitz & Zohary 1966) oder *Ipomoea purpurea* (Epperson & Clegg 1987). Dieser Polymorphismus könnte sich dann über Genfluss zwischen den Populationen ausbreiten, so nachgewiesen etwa in *Phlox drummondii* (Levin & Schmidt 1985).

3.1.3. Fragestellungen

Ziel der Untersuchungen war:

1. Die Quantifizierung des Anteils der roten, lila bzw. weißen Farbmorphen von *Anemone pavonina* in verschiedenen Höhenstufen an den Hängen des Olymps, Nord-Griechenland.
2. Zu bestimmen, welche Blütenbesucher auf den einzelnen Farbmorphen vorzufinden sind.
3. Zu testen, welche Farbe in Wahlversuchen von Vertretern pollenfressender bzw. blütenbesuchender Käfer – besonders Vertretern der Glaphyridae – bevorzugt werden, und
4. welche Farbmorphe Bienen beim Sammeln von Pollen auf *A. pavonina* bevorzugen.

3.2. Material & Methoden

3.2.1. Untersuchungsgebiet und -zeitraum

Durchgeführt wurden die Untersuchungen vom 26.4. bis zum 2.5.2010 in Nord-Griechenland, Thessalien, in der Nähe der Stadt Ellassona an den Hängen des Mt. Olympus und an einem weiteren Standort einige Kilometer außerhalb von Ellassona, als „Helene_1“-Stelle bezeichnet. Die genauen GPS-Koordinaten (Garmin Vista Extrex) sowie die Höhenlage und die Hangausrichtung der einzelnen Untersuchungsstandorte sind im Anhang, Tab.4 angeführt.

3.2.2. *Anemone pavonina*

Anemone pavonina Lam. (Pfaunenane-mone; Abb.7) gehört zur Familie der Ranunculaceae und hat 7-12 breitere Blütenhüllblätter, mit oftmals gelben oder weißen Tepalbasen. Die Blütenfarben reichen von scharlachrot über verschiedene rosafarbene bis weiße Formen bis zu lila oder purpurnen Morphen. Die Art kommt lokal von Südwest-Frankreich bis in die Türkei vor (Schönfelder & Schönfelder 2002). *Anemone pavonina* ist mehrjährig mit einsamigen Schließfrüchten und kann eine Höhe von bis zu 30 cm erreichen (Bojňanský & Fargašová 2007).



Abb.7: *Anemone pavonina*. Gut erkennbar sind die weißlich-gelblichen Tepalbasen, die bei einem Teil der Blüten auftreten können. Foto: Nicole Sommer

3.2.3. Reflexionsspektrum von *Anemone pavonina*

Die Reflexionsspektren wurden für insgesamt 10 lila Blüten, 20 rote Blüten (darunter auch rote Blüten mit Blauanteil = rosa) und 2 weiße Blüten ermittelt. Durchgeführt wurden die Messungen mit einem USB 2000-Spektrometer mit Deuterium/Halogen-Lampe (OceanOptics). Gemessen wurde eine ca. 0.25 cm² große Fläche eines zufällig ausgewählten Blütenblattes und kalibriert mit einem Weißstandard (WS-1; OceanOptics). Die Datenverarbeitung erfolgte über Spectra Suite (OceanOptics), Diagramme aus den Mittelwerten aller Datenpunkte für die jeweiligen Farben wurden mittels Excel (Version 2003) erstellt.

3.2.4. Farbmorphenverteilung

Betrachtet wurde hierbei die Verteilung der Morphen rot, lila und weiß (Abb.8) von *Anemone pavonina* auf unterschiedlichen Höhenstufen. Insgesamt wurde die Farbverteilung an 25 Standorten (Anhang, Tab.4) an den Hängen des Olympos quantifiziert. An jedem Standort wurden randomisiert je 10 Areale mit je einem Umfang von 0.5 m x 0.5 m (0.25 m²) abgesteckt und die jeweilige Anzahl an roten, lila und

weißen Blüten abgezählt. Berücksichtigt wurden dabei nur eindeutig zuzuordnende Blüten, die rosafarbenen (rot mit Blauanteil) Blüten wurden weitestgehend ignoriert, wenn eine eindeutige Zuordnung schwierig war. Die prozentuellen Mittelwerte wurden mit SPSS (Version 10) einer bivariaten Korrelationsanalyse nach Spearman unterzogen. Die grafische Darstellung erfolgte mittels Sigma-Plot (Version 11) und Excel (Version 2003).



Abb.8: Die verschiedenen Farbmorphen von *Anemone pavonina*. Zu sehen sind die weiße, die lila, die rote und die rosa (= rot mit Blauanteil) Morphe. Fotos: Nicole Sommer

3.2.5. Blütenbesuche

Die Anzahl von Käfern der Gattung *Pygopleurus* (Glaphyridae) auf den Blüten von *Anemone pavonina* wurde ebenfalls an den selben 25 Standorten (siehe 3.2.4; Anhang, Tab.4) quantifiziert. Dazu wurden jeweils so viele Blüten wie möglich abgezählt und die Anzahl der unbesetzten vs. die Anzahl der von einem Käfer besetzten Blüten ermittelt. Nicht miteinbezogen wurden Standorte, an denen weniger als 50 Blüten einer der beiden Farbmorphen (rot bzw. lila) vorhanden waren. Errechnet wurde anschließend die Zahl der Käfer pro 100 roten bzw. lila Blüten. Die statistische Analyse in Form eines nicht-parametrischen Tests nach Mann-Whithney erfolgte mittels SPSS (Version 10), die grafische Darstellung mittels SPSS (Version 10) und Excel (Version 2003).

3.2.6. Becherfallen

Je drei gefärbte, mit wenig Wasser gefüllte Plastikbecher (Höhe: 9 cm; Ø: 4-7 cm) in den Farben rot, orange, gelb, weiß, blau und violett wurden auf Holzstöcken in etwa 15-25 cm Höhe platziert, um die Höhe der echten Blüten zu imitieren, da schon in früheren

Arbeiten gezeigt wurde, dass die Höhe die Anflugwahrscheinlichkeit der Käfer beeinflusst. Die Käfer scheinen eher auf solchen Modellen zu landen, die der Höhe ihrer bevorzugten Blüten entsprechen (Dafni & Potts 2004). Insgesamt wurden die Versuche an zwei verschiedenen Standorten durchgeführt, bezeichnet als „Helene_1“-Stelle (Standort A) und „Mistkäfer“-Stelle (Standort B) (Anhang, Tab.4) Die gefangenen Tiere wurden jede halbe Stunde ausgezählt und aus den Bechern entfernt. Insgesamt wurden die Becher für 9 Stunden an Standort A und 5.5 Stunden an Standort B platziert. Die statistische Auswertung erfolgte in Form eines Mehrfeldertests mittels Statistica (Version 7), die grafische Darstellung mittels Excel (Version 2003).

3.2.7. Bienenbesuche

An Standort 13 (Anhang, Tab.4) wurde die Anzahl der Bienenbesuche (*Apis mellifera*) auf die verschiedenen Farbmorphen von *Anemone pavonina* quantifiziert. Dazu wurden einzelne Bienen verfolgt und ihre Anflüge auf einzelne Blüten vermerkt. In die Endauswertung wurden nur Bienen miteinbezogen, die bei mindestens 6 aufeinanderfolgenden Blütenbesuchen beobachtet werden konnten. Der Besuch der Bienen von lila Blüten wurde in Bezug zum ermittelten Gesamtanteil der lila Blüten an diesem Standort gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe eines t-Tests mittels SPSS (Version 10), die grafische Darstellung mittels Excel (Version 2003).

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Reflexionsspektrum von *Anemone pavonina*

Das Reflexionsspektrum der lila Farbmorphe von *Anemone pavonina* zeigte deutliche Peaks im Rotbereich (> 565 nm) und im Blaubereich (~400-500 nm). Ebenfalls deutlich wurde eine relativ hohe UV-Reflexion (~300-400 nm) bei dieser Farbmorphe (Abb.9). Die weiße Farbmorphe zeigte eine hohe Reflexion im gesamten Wellenlängenbereich mit deutlicher Abnahme unterhalb 400 nm (Abb.10).

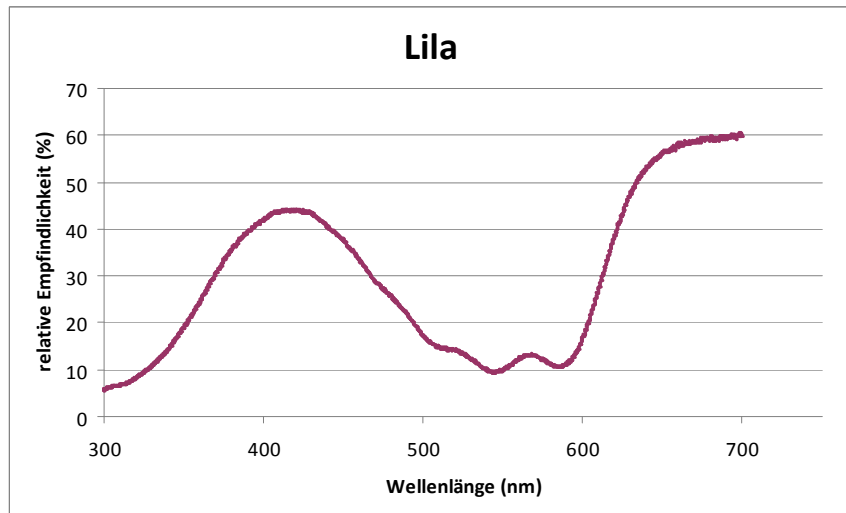


Abb.9: Reflexionsspektrum der lila Morphe von *Anemone pavonina*. Die Abszisse stellt die Wellenlänge in Nanometer, die Ordinate die relative Reflexion in Prozent dar. Reflexion zeigte sich im UV-, Blau- und Rotbereich.

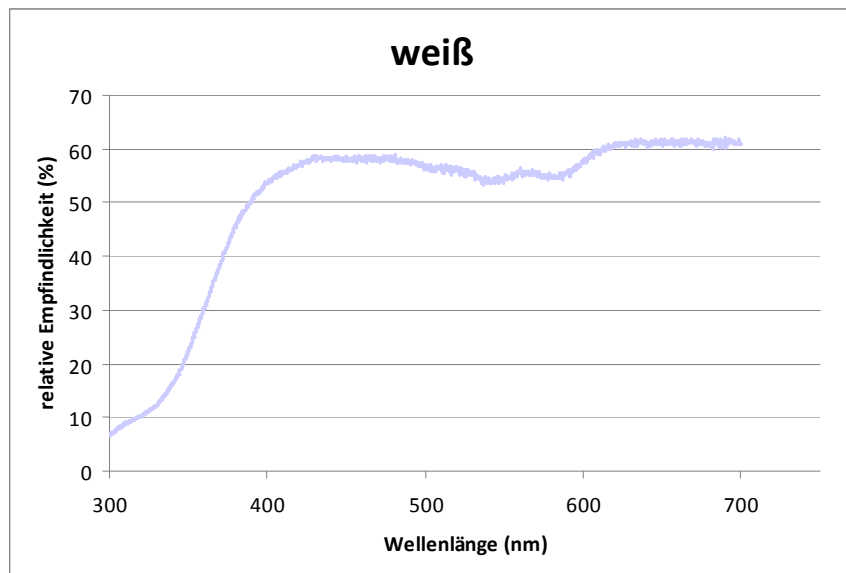


Abb.10: Reflexionsspektrum der weißen Morphe von *Anemone pavonina*. Die Abszisse stellt die Wellenlänge in Nanometer, die Ordinate die relative Reflexion in Prozent dar. Reflexion zeigte sich im gesamten Wellenlängenbereich und fällt unter 400 nm stark ab.

Die roten Blüten reflektierten ausschließlich im Bereich über 580 nm (Abb.11), während die rosa Blüten (= rot mit Blauanteil) einen deutlichen Peak im Rotbereich und einen kleineren, dennoch klar erkennbaren Peak im Blaubereich zeigten (Abb.12).

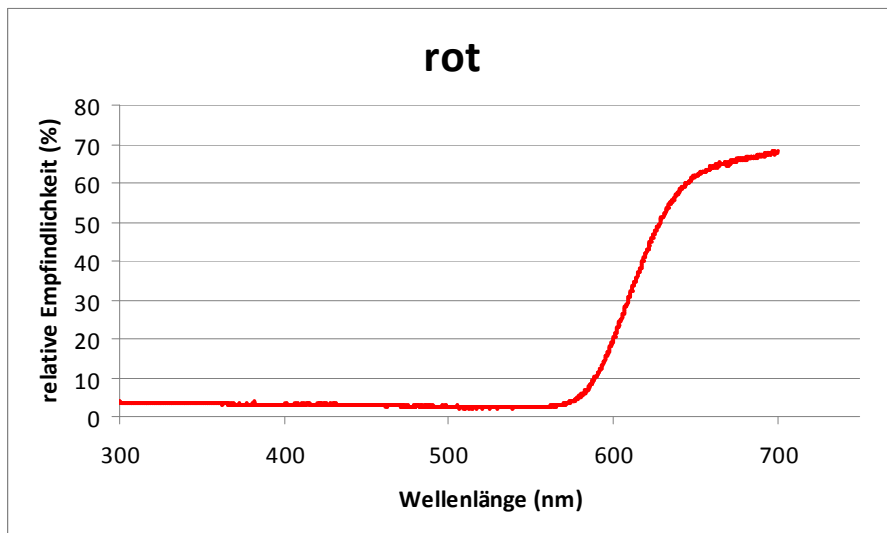


Abb.11: Reflexionsspektrum der roten Morphe von *Anemone pavonina*. Die Abszisse stellt die Wellenlänge in Nanometer, die Ordinate die relative Reflexion in Prozent dar. Reflexion fand sich bei dieser Blütenmorphe ausschließlich im Rotbereich.

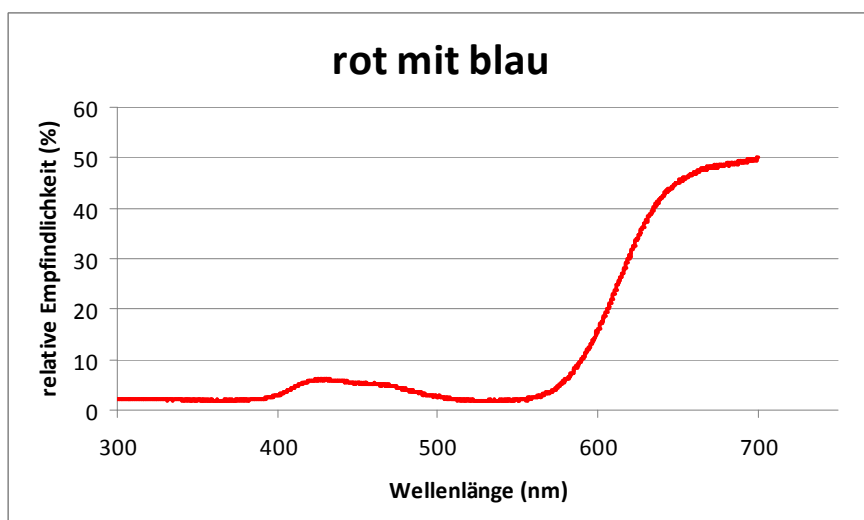


Abb.12: Reflexionsspektrum der rosa Morphe von *Anemone pavonina*. Die Abszisse stellt die Wellenlänge in Nanometer, die Ordinate die relative Reflexion in Prozent dar. Reflexion zeigte sich im Rotbereich mit einem zusätzlichen kleinen Peak im Blaubereich.

3.3.2. Farbmorphenverteilung

Abb.13 zeigt den Anteil der roten Farbmorphe von *Anemone pavonina* bezogen auf alle quantifizierten Blüten in unterschiedlichen Höhenstufen an den insgesamt 25 untersuchten Standorten. Eine signifikante negative Korrelation ist erkennbar ($p < 0.001$; $r_s = -0.886$). Umgekehrt stieg der Anteil der lila Morphe mit zunehmender Höhe. Unter einer Höhe von etwa 1100 m waren alle gefundenen Populationen rot, über einer Höhe von etwa 1200 m alle lila, im Zwischenbereich gab es Mischpopulationen.

Gesamt konnten 64.9 % rote, 34.4 % lila und 0.6 % weiße Blüten quantifiziert werden in insgesamt 10 roten, 5 lila und 10 gemischten Populationen.

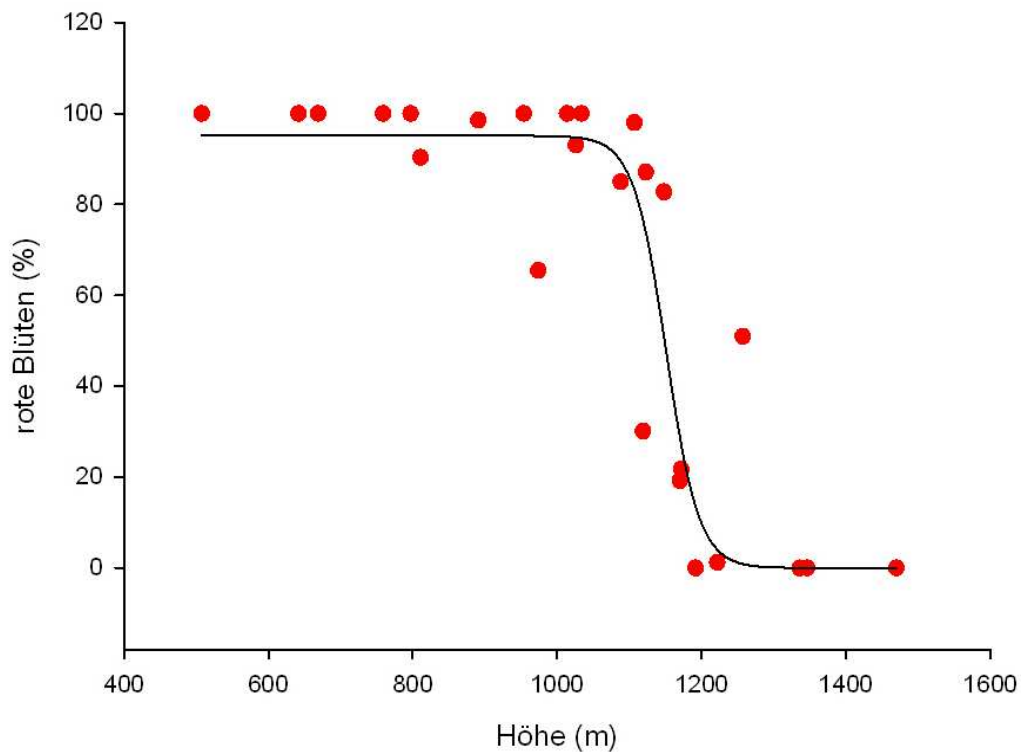


Abb.13: Prozentueller Anteil der roten Formmorphie je nach Höhenlage. Dargestellt sind auf der Abszisse die Seehöhe in Meter, auf der Ordinate der Anteil der roten Blüten je Standort in Prozent. Die schwarze Linie stellt die sigmoidale Trendlinie dar.

3.3.3. Blütenbesuche

Die Analysen ergaben eine im Vergleich signifikant größere Anzahl von *Pygopleurus spec.* in den roten als in den lila Blüten ($p = 0.002$; $Z = - 3.142$), mit Mittelwerten von 2.10 ± 3.25 Käfern/100 Blüten in roten bzw. 0.22 ± 0.44 Käfern/100 Blüten in lila Blüten (Abb.14).

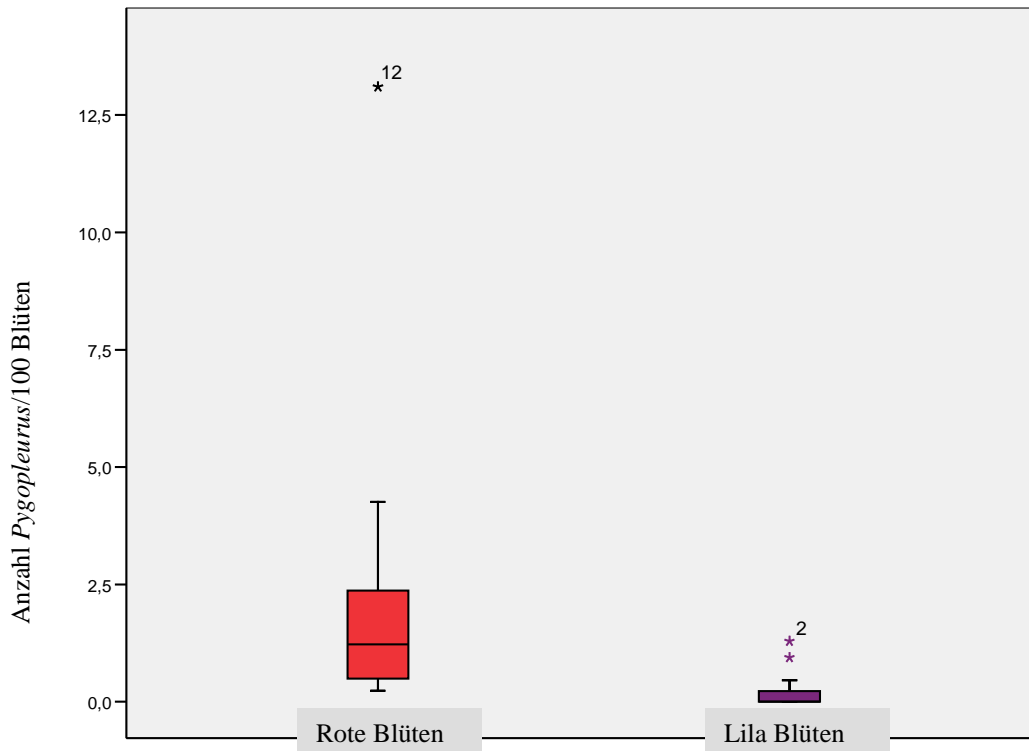


Abb.14: Blütenbesuche von *Pygopleurus spec.* auf rote und lila Blüten von *Anemone pavonina*. Dargestellt ist die Anzahl der quantifizierten *Pygopleurus* auf je 100 ausgezählte rote bzw. lila Blüten. * stehen für die Standorte, an denen im Vergleich überdurchschnittlich viele Käfer gefunden wurden.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Anzahl der gefundenen Käfer pro 100 Blüten und der Höhenlage ergab sich nicht. Es gab einige wenige Standorte, an denen verhältnismäßig viele Käfer beobachtet werden konnten, ansonsten schienen die Häufigkeiten nicht mit der Höhe zu korrelieren (Abb.15).

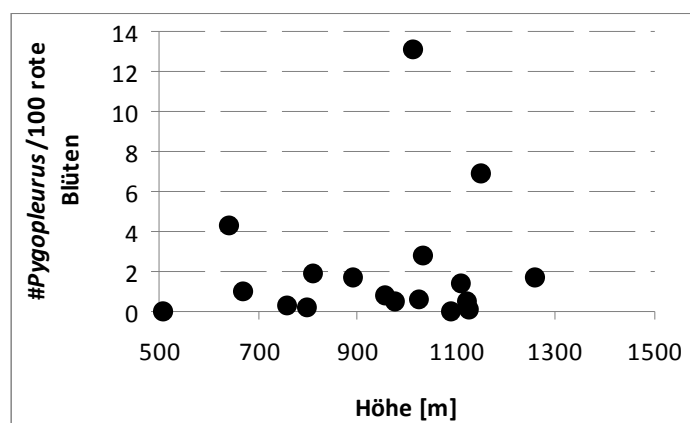


Abb.15: Anzahl von *Pygopleurus spec.* je 100 rote Blüten in Abhängigkeit von der Höhenlage. Die Abszisse gibt die Seehöhe in Meter an, die Ordinate die Anzahl der quantifizierten *Pygopleurus* bezogen auf 100 rote Blüten.

3.3.4. Becherfallen

An der „Helene_1“-Stelle konnten insgesamt 62 Käfer der Gattung *Pygopleurus*, sowie 52 Vertreter der Dasytidae und 13 Individuen von *Tropinota hirta* in den Bechern gefangen werden. Die meisten *Pygopleurus spec.* (N = 34) wurden in den roten Bechern gefunden. Ebenfalls relativ viele Vertreter dieser Gattung (N = 21) fanden sich in den orangen Bechern. Keine *Pygopleurus* allerdings konnten in den weißen und blauen Bechern gefunden werden. Dasytidae wurden hauptsächlich in den weißen (N = 24) sowie den blauen Bechern (N = 13) gefangen, während *Tropinota hirta* bevorzugt in die blauen Becher (N = 9) flogen (Abb.16). Sowohl bei *Pygopleurus* (Chi^2 : 95.355; $p < 0.0000001$), Dasytidae (Chi^2 : 45.615; $p < 0.0000001$) als auch *Tropinota hirta* (Chi^2 : 29.000; $p = 0.000023$) zeigte sich deutlich, dass die Käfer unterschiedliche Farben bevorzugen.

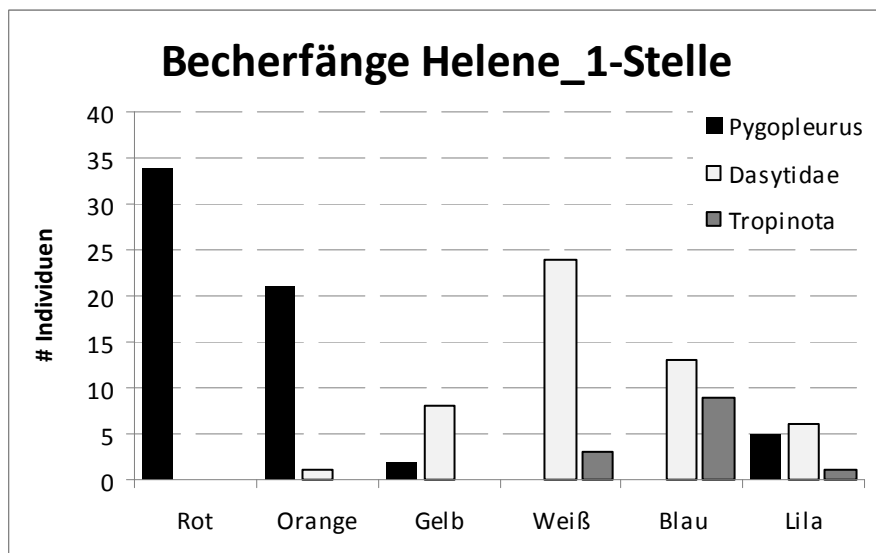


Abb.16: Anzahl der gefangenen Käfer in den verschiedenfarbigen Bechern an der „Helene_1“-Stelle. Auf der Abszisse dargestellt sind die einzelnen Becherfarben, auf der Ordinate die Anzahl der gefangenen Käfer. Die schwarzen Balken repräsentieren *Pygopleurus*, die hellgrauen Balken Vertreter der Dasytidae und die dunkelgrauen Balken *Tropinota hirta*.

Am anderen Standort („Mistkäfer“-Stelle) konnten insgesamt 15 *Eulasia spec.*, 2 Dasytidae und je 1 *Tropinota hirta* und 1 *Pygopleurus* gefangen werden. Die meisten Vertreter der Gattung *Eulasia* wurden in den gelben Bechern (N = 6) gefangen. Aber auch in den orangen (N = 4) und in den roten Bechern (N = 3) fanden sich mehrere Vertreter dieser Art. Die einzige Farbe, in denen diese Käfer nicht gefunden werden konnten, waren die weißen Becher. Je 1 Dasytidae wurde in den weißen bzw. blauen Bechern gefangen, während 1 *Pygopleurus* in den roten und 1 *Tropinota hirta* in den

violetten Bechern gefangen wurde (Abb.17). Der Zusammenhang zur Becherfarbe sowohl bei *Pygopleurus* (Chi^2 : 5.000; $p = 0.416$), *Eulasia* (Chi^2 : 10.200; $p = 0.07$), Dasytidae (Chi^2 : 4.000; $p = 0.549$) als auch *Tropinota hirta* (Chi^2 : 5.000; $p = 0.416$) stellte sich hier, vermutlich aufgrund der geringen Stichprobe, allerdings als nicht signifikant heraus.

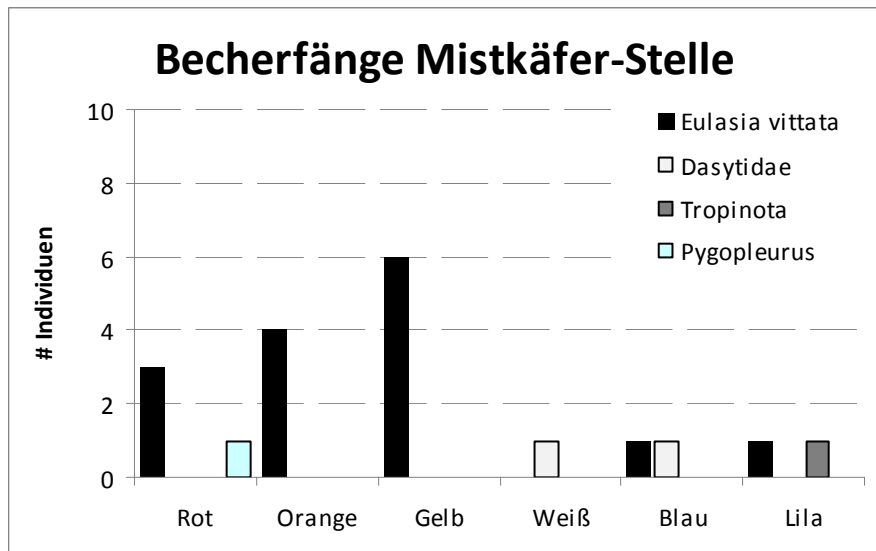


Abb.17: Anzahl der gefangenen Käfer in den verschiedenfarbigen Bechern an der „Mistkäfer“-Stelle. Auf der Abszisse dargestellt sind die einzelnen Becherfarben, auf der Ordinate die Anzahl der gefangenen Käfer. Die schwarzen Balken repräsentieren *Eulasia*, die hellgrauen Balken Vertreter der Dasytidae, die dunkelgrauen Balken *Tropinota hirta* und die helltürkisen Balken *Pygopleurus*.

An beiden Standorten gesamt wählten 35 Käfer (~55.6 %) der Gattung *Pygopleurus* die roten Becher und 21 (~33.3 %) die orangen Becher. Auch in den lila und gelben Bechern konnten Vertreter dieser Käfer gefangen werden. Vertreter der Gattung *Eulasia* konnten nur am Standort „Mistkäfer“-Stelle gefangen werden. Die einzige Farbe, in denen diese Käfer nicht gefangen werden konnten, war weiß. Die meisten dieser Käfer gingen in die gelben (40 %), orangen (~26.7 %) und roten (20 %) Becher. Vertreter der Dasytidae bevorzugten an beiden Standorten insgesamt weiße (~46.3 %), *Tropinota hirta* blaue (~64.3 %) Becher.

3.3.5. Bienenbesuche

Insgesamt wurden 37 Bienen beobachtet, von denen allerdings nur 21 in die endgültige Auswertung miteinbezogen wurden, da von diesen Individuen mindestens 6 aufeinanderfolgende Blütenbesuche beobachtet werden konnten. Die Anzahl der beobachteten Blütenanflüge je Individuum reichte von 6 bis 18. Die prozentuale

Anflugshäufigkeit auf lila Blüten reichte von 45.5 % bis 100 % bei den einzelnen Bienen.

Der Anteil der lila Blüten an diesem Standort betrug 65.8 %. Die Bienen besuchten während ihres Sammelflugs 85.4 ± 16.5 % lila Blüten, und wählten diese Blütenfarbe somit signifikant häufiger als der Erwartungswert von 65.8 % erwarten lassen würde ($p = 0.012$; $T = 2.73$) (Abb.18).

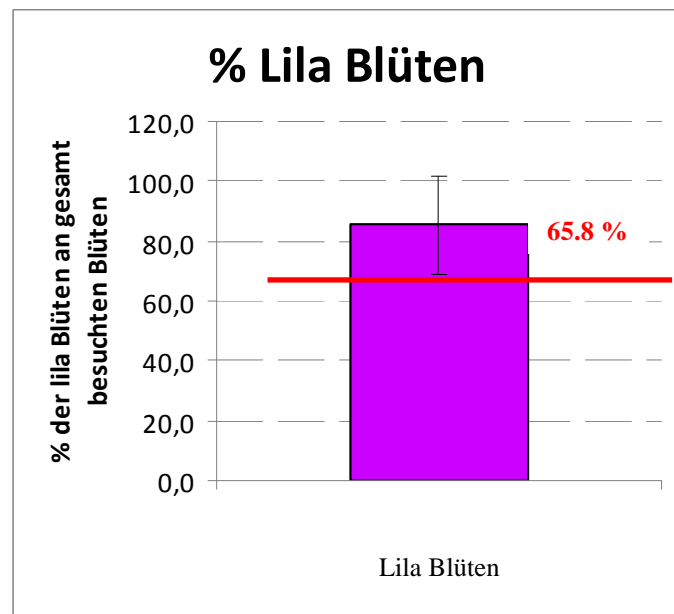


Abb.18: Anteil der von *Apis mellifera* besuchten lila Blüten bezogen auf die Gesamtblütenbesuche. Die Ordinate repräsentiert den Anteil der von den insgesamt 21 Bienen besuchten lila Blüten bezogen auf alle Blütenbesuche dieser 21 Bienen. Die rote Linie stellt den Anteil der lila Blüten an der Gesamtanzahl der quantifizierten Blüten (65.8 %) an Standort 13 dar.

3.4. Diskussion

3.4.1. Reflexionsspektrum von *Anemone pavonina*

Bei der Vermessung der Reflexionsspektren der einzelnen Farbmorphen hat sich ergeben, dass sowohl die lila als auch die weiße Morphe unter anderem UV-Reflexion aufweisen, während die rote und die rosa (= rot mit Blauanteil) Morphe ausschließlich im Rotbereich bzw. im Rot- und etwas im Blaubereich reflektieren.

Die meisten Insekten weisen Empfindlichkeitsmaxima von < 530 bis maximal 560 nm auf. Dies trifft vermutlich auch auf die Honigbiene zu (für weitergehende Erläuterungen dazu siehe Kap. 3.4.5), sodass sie rote Blüten vermutlich nur schwer detektieren kann. Da die Bienen jedoch UV wahrnehmen können (Briscoe & Chittka 2001), können rote Blüten mit UV-Reflexion auch von Bienen besucht werden (Dafni et al. 1990), während

rote Blüten ohne UV-Anteil für Bienen eher ungünstig sind, da sie für die Bienen wesentlich schwerer zu detektieren sind.

Die Tatsache, dass rote Blüten der Gattung *Anemone* im Mittelmeerbereich offenbar keine UV-Reflexion aufweisen, deckt sich mit früheren Untersuchungen (Dafni et al. 1990; Menzel & Shmida 1993). Dass Vertreter der Mohngilde, z.B. *Papaver rhoeas*, außerhalb des Mittelmeerraums durchaus UV-Reflexion aufweisen, dort allerdings von Bienen bestäubt werden (Daumer 1958), ist besonders hervorzuheben. Die roten Blüten der „Mohngilde“ im Mittelmeergebiet dagegen weisen ausschließlich Rot-Reflexion in einem Bereich zwischen 655 und 700 nm auf und werden bevorzugt von Käfern der Familie Glaphyridae besucht (Dafni et al. 1990). Diese Ergebnisse decken sich ziemlich genau mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen.

3.4.2. Farbmorphenverteilung

Es zeigte sich ein deutlich signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhenlage einerseits und der Häufigkeit der unterschiedlichen Farbmorphen von *Anemone pavonina* andererseits. In tieferen Lagen kam ausschließlich die rote, in höheren Lagen ausschließlich die lila Form vor. In den dazwischen liegenden Höhen kamen Mischpopulationen vor. Dieser Zusammenhang wurde nach aktuellem Wissenstand bei dieser Familie vorher noch nicht nachgewiesen. 10 der Untersuchungsstandorte wiesen rein rote, 5 rein lila Populationen und 10 Standorte Mischpopulationen auf. Die weiße Farbmorphe war dabei am seltensten, mit nur 0.6 % der gesamt quantifizierten Blüten, und zeigte keine höhenpezifischen Wuchspräferenzen.

Ein Beispiel, wo die Seltenheit der weißen Morphe durch Bestäuberselektion zu erklären sein könnte, ist *Delphinium nelsonii* (Ranunculaceae). Weiße Blüten produzieren im Verhältnis zu den färbigen Morphen deutlich weniger Samen. Die Bestäuber besuchen die weiße Morphe seltener, da es für diese zeitaufwändiger zu sein scheint, Nahrung in den weißen als in andersfärbigen Blüten zu sammeln (Waser & Price 1981, 1983). Ein Grund für Stabilität einzelner Populationen bei Blütenpflanzen könnte also das Faktum sein, dass seltene Blütenmorphen innerhalb einer Population – sei es eine seltenere Blütenform oder -farbe – weit weniger gerne von Blütenbesuchern angenommen und somit besucht werden als die jeweilige dominante Form (Epperson & Clegg 1987; Jones & Reithel 2001).

Eine ähnliche Untersuchung wie in der vorliegenden Arbeit zum Zusammenhang zwischen Seehöhe und Blütenfarbe wurde bei *Polemonium viscosum* Nutt (Polemoniaceae) durchgeführt (Galen & Kevan 1980). Die Blüten können hellblau, violett oder blau-lila sein. Die Autoren fanden heraus, dass die hellblaue Morphe signifikant häufiger an teilweise beschatteten Krummholz-Standorten – also eher tieferliegend – zu finden ist, während die blau-lila Morphe eher im alpinen Bereich auftritt. Eine Erklärung dafür sehen die Autoren in der relativen Erkennbarkeit der zwei Farbmorphen auf den jeweiligen Hintergrund bezogen.

Horovitz (1976) dagegen sieht eine Ursache für den Farbpolymorphismus einiger Arten der Gattung *Anemone* in edaphischen Faktoren ihrer unterschiedlichen Wuchsstandorte begründet. In Israel etwa kommen monomorphe Kolonien mit roten Blüten bei *Anemone coronaria* L. häufiger vor und sind auf allen Bodentypen vorzufinden. Auf der anderen Seite sind polymorphe Kolonien mit vorwiegend lila oder violetten Blüten, die daneben auch Blüten mit rosa, weißer oder roter Färbung aufweisen können, auf Wuchsstandorte beschränkt, die aus Dolomitgestein bestehen, mit nicht-ausgesolter mineralreicher Terra Rossa Erde oder schweren Alluvialböden. Nur weiße und hellrosa Morphen, gemeinsam mit roten Formen, treten auf Böden auf, die aus nicht-ausgesolter Terra Rossa bestehen, sowie auf Basaltböden (Horovitz et al. 1975; Horovitz 1976).

Diese Bodenunterschiede gehen mit veränderten pH-Werten an den einzelnen Standorten einher. Da die Blüten der Gattung *Anemone* Anthocyane enthalten und diese abhängig vom pH-Wert Farbumschläge produzieren (Castañeda-Ovando et al. 2009; Cooper-Driver 2001), könnten so eventuell auch die unterschiedlichen Häufigkeiten der einzelnen Farbmorphen von *Anemone pavonina* erklärt werden.

Unterschiedliche Bodenverhältnisse könnten also eine Ursache für die verschiedenen Farbausprägungen an den einzelnen Standorten sein. Im Fall von *Anemone pavonina* am Olymp könnten edaphische Faktoren ebenfalls eine Rolle spielen, da die roten und lila Populationen auf unterschiedlichen Höhenstufen vorkommen. Allerdings scheint diese Erklärung aufgrund des Vorhandenseins von Mischpopulationen in diesem Fall eher unwahrscheinlich zu sein. Genauere Aufschlüsse könnten nur Bodenanalysen geben. Allerdings könnten pH-Verhältnisse des Bodens neben Bestäuberselektion als weiterer möglicher Faktor die Seltenheit der weißen Morphe erklären, da diese Färbung auf andere pH-Werte angewiesen ist als die rote oder violette Form (Castañeda-Ovando et al. 2009; Cooper-Driver 2001).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Ausprägung des Farbpolymorphismus könnten vor allem auch die Bestäubersyndrome der jeweiligen Morphe darstellen. Die Reaktion der Bestäuber auf Blütenfarbsignale ist ebenfalls ein entscheidender Faktor für verschiedene Farbausprägungen in natürlichen Populationen. Die jeweiligen Bestäuber sorgen dafür, dass ihre bevorzugte Blütenfarbe dominant bleibt (Horovitz 1976). Wenn man beachtet, dass die rote Morphe von *Anemone pavonina* fast ausschließlich von Käfern der Gattung *Pygopleurus*, die lila Morphe dagegen verstärkt von *Apis mellifera* besucht zu werden scheint (siehe Kap.3.5), stellt sich diese Theorie als die wahrscheinlichere dar. Es wäre daher wichtig zu untersuchen, in welcher Höhe die Gattung *Pygopleurus* ihre Verbreitungsgrenze hat.

Die jeweiligen Bestäuber üben also einen großen Einfluss auf die Farbverteilung der Blüten aus, da sie Präferenzen für einzelne Farbmorphen zeigen (u.a. Gigord et al. 2001; Irwin & Strauss 2005). In solch einem Fall könnte lokal begrenzter Farbpolymorphismus eventuell durch eine Kombination aus pleiotropen Effekten mit durch die jeweiligen Bestäuber ausgeübter Selektion erklärt werden (u.a. Irwin & Strauss 2005). Auch bei *Anemone pavonina* ist eine Kombination dieser möglichen Ursachen nicht auszuschließen, müsste allerdings durch weitere Untersuchungen näher betrachtet werden.

3.4.3. Blütenbesucher

Pygopleurus spec. besuchten signifikant häufiger rote als lila Blüten. Allerdings war die Standartabweichung in beiden Fällen, vor allem bei den Besuchen der roten Blüten, sehr hoch. Das liegt vermutlich an der großen Variation der Gesamtpopulation der Käfer an den verschiedenen Standorten. An den Standorten 20 und 24 z.B. konnten überhaupt keine Käfer nachgewiesen werden, bei insgesamt 111 bzw. 436 ausgezählten roten Blüten, während am Standort 15 durchschnittlich 13.10 Käfer/100 rote Blüten, von insgesamt 145 ausgezählten roten Blüten, gefunden werden konnten.

Eine höhenmäßige Tendenz in der Anzahl der in den roten Blüten vorgefundenen Käfer ergab sich nicht. Die Verteilung erschien als mehr oder weniger ausgeglichen, mit einigen Ausreißern nach oben. Allerdings war die Anzahl der Käfer in den Blüten durchwegs zu gering, um klare Aussagen treffen zu können. Beobachtungen aus vorangehenden Jahren legen jedoch nahe, dass sich ein eindeutiger Trend zeigt, nachdem die Käfer der Gattung *Pygopleurus* eher in tieferen Lagen, an denen die roten

Blüten vorkommen, vorzufinden sind, allerdings nicht mehr in den höheren Lagen, wo nur mehr die lila Morphe vorkommt (persönliche Kommunikation Hannes Paulus, Johannes Spaethe).

Durchschnittlich konnten an den einzelnen Standorten bezogen auf 100 Blüten meist nur unter 3 Käfer gefunden werden. Zwei Standorte stachen mit ~13 bzw. ~7 Käfer pro 100 Blüten allerdings deutlich heraus.

Die Tatsache, dass *Pygopleurus spec.* die roten Blüten bevorzugten, lässt sich vermutlich wiederum auf das Faktum zurückführen, dass sie die Farbe Rot (ohne UV-Reflexion) im Gegensatz zu Bienen vermutlich sehr gut wahrnehmen können, wie Untersuchungen gezeigt haben (Dafni et al. 1990; Martinez-Harms et al. unveröffentlicht). Da *Apis mellifera* verstärkt die lila Morphe besuchte, welche zusätzlich UV-Reflexion aufweist, besuchen die Käfer möglicherweise auch aus diesem Grund eher die roten Blüten. Die Käfer können höchstwahrscheinlich beide Farben wahrnehmen, da aber die Bienen vorwiegend Pollen an den lila Blüten sammeln, ist es für die Käfer in Hinsicht auf interspezifische Konkurrenz vermutlich vorteilhafter, die roten Blüten zu besuchen. Ein weiterer Faktor ist, dass die Blüten für die Käfer auch Paarungsplätze darstellen. Die Chance, einen Partner zu finden, ist in roten Blüten exponentiell höher als in andersfärbigen. Das Sammeln von Pollen würde in diesem Fall eher nebenbei in den roten Blüten geschehen, da die Käfer sich sowieso schon dort befinden.

3.4.4. Becherfallen

Insgesamt zeigte sich vor allem bei *Pygopleurus spec.* ein klarer Trend. An beiden Standorten gesamt wählten 55.6 % die roten Becher und ~33.3 % die orangen Becher. In den blauen Bechern konnten keine Vertreter von *Pygopleurus* gefangen werden. *Eulasia* fanden sich nur am Standort „Mistkäfer“-Stelle in den Fallen. Die einzige Farbe, in denen diese Käfer nicht gefangen werden konnten, war weiß. Überraschenderweise fand sich ein Vertreter dieser Art in den blauen Bechern. Das könnte allerdings auch Zufall gewesen sein, da $N = 1$ nicht sehr aussagekräftig ist. Nur größere Stichprobenzahlen könnten die Frage beantworten, ob der eine Anflug auf blau von *Eulasia* ein Zufallsprodukt war oder nicht. Die meisten dieser Käfer gingen in die gelben, orangen und roten Becher. Vertreter der Dasytidae bevorzugten weiße, *Tropinota hirta* eindeutig blaue Becher. Die Ergebnisse vom Standort „Helene_1“-

Stelle erwiesen sich als signifikant, während die Ergebnisse beim Standort „Mistkäfer“-Stelle aufgrund der zu geringen Stichprobenzahl durchwegs nicht signifikant sind.

Das durchgeführte Experiment beruhte auf einem Versuch von Dafni et al. (1990) an drei verschiedenen Standorten in Israel, der ebenfalls Becherfallen, allerdings in den Farben rot, weiß, braun, grün, blau und gelb verwendete und Käfer der Gattungen *Eulasia* und *Pygopleurus* (= „*Amphicoma*“ *sensu* Dafni et al. 1990) quantifizierte. Insgesamt wurden in den Bechern 146 Käfer gefangen, von denen 128 (~87 %) in den roten Bechern landeten. Zu berücksichtigen ist dabei, dass Dafni et al. (1990) keine orangefarbenen Becher verwendeten – die in ihrem Reflexionsspektrum rot sehr ähneln –, sondern Farben wie grün oder braun, die eher als Kontrastfarben zur Darstellung von Hintergrundelementen wie Gras, Blattwerk, Stängeln oder Stammmaterial dienen, als als Blütenfarben, und so von den Käfern verständlicherweise eher ignoriert werden. Im Großen und Ganzen konnte die Präferenz von Käfern der Gattung *Pygopleurus* für die Farbe rot in der vorliegenden Arbeit aber ebenfalls bestätigt werden.

3.4.5. Bienenbesuche

Die Bienen wählten am Untersuchungsstandort signifikant häufiger als erwartet die lila im Vergleich zu den roten Blüten. Erklärungsansätze lassen sich eventuell im visuellen System der Bienen finden. Es scheint allerdings nach wie vor nicht ganz geklärt zu sein, ob Honigbienen die Farbe Rot wahrnehmen können oder nicht.

Kühn (1924) etwa nahm an, dass Bienen rot sehen können, da ihre Wahrnehmungsgrenze für langwelliges Licht bei etwa 650 nm liegt. Daumer (1956) sowie von Frisch (1965) dagegen fanden in Experimenten heraus, dass Bienen anscheinend orange sehen können, rot für sie dagegen nicht zu erkennen sei. Und wenn man nach von Helversen (1972) geht, so können die Bienen zwischen 530 und 650 nm – also im Bereich grün bis rot – keine Wellenlängen unterscheiden. Auch Peter Raven (1972) ging davon aus, dass Vogelblüten vorwiegend rot sind, da die Farbe Rot nicht nur mit großem Energiegewinn assoziiert werden könne, sondern diese auch unauffällig und nicht zu erkennen wäre für die meisten Insekten, unter anderem auch Bienen. Auch Briscoe & Chittka (2001) nehmen an, dass Honigbienen die Farbe rot nicht sehen können. Diese gegensätzlichen Ergebnisse führten zu der allgemeinen Meinung, dass Bienen vermutlich kein Rot sehen können, sondern nur verschiedene Helligkeitsstufen im Rotbereich unterscheiden können.

Allerdings scheinen einige rein rote, UV-absorbierende Blüten zumindest sekundär von Bienen besucht zu werden. Eine mögliche Erklärung dafür gaben Chittka & Waser (1997). Im Farbraum der Bienen fallen die Punkte für monochromatisches Licht ab einer Wellenlänge von etwa 550 nm (im Bereich grün bis rot) auf einen Punkt zusammen und sind daher nicht mehr unterscheidbar. Der Grund dafür, dass sie aber trotzdem rot sehen können, sehen Chittka & Waser (1997) darin, dass in der normalen Umgebung einer Biene andere Verhältnisse vorherrschen, da Blüten und Blattwerk kein monochromatisches Licht, sondern Licht über einen großen Spektralbereich hinweg reflektieren. Rote Blüten wären so keineswegs unsichtbar für die Bienen, sondern könnten durchaus über die Stimulierung des Grün-Rezeptors als achromatisches Signal gegen den Hintergrund wahrgenommen werden. Aufgrund der eher widersprüchlichen Ansichten vieler Autoren kann daher nach wie vor nicht mit absoluter Klarheit gesagt werden, ob die roten, nicht UV-reflektierenden Blüten im Mittelmeerbereich, wie angenommen, für Bienen tatsächlich schwarz erscheinen.

Die Frage, ob Honigbienen die Farbe rot nun perzipieren können oder nicht, ist also nicht klar zu beantworten. Fest steht allerdings, dass sie UV perzipieren können (u.a. Briscoe & Chittka 2001). Da die lila Morphe im Gegensatz zur roten oder rosa Farbmorphe allerdings UV-Reflexion aufzuweisen scheint (Kap.3.3.1) und so definitiv von den Bienen gesehen werden kann, lässt sich die Präferenz für lila Blüten gegenüber den roten Blüten bei der Honigbiene wohl durch diesen Fakt erklären, unabhängig davon, ob die Bienen rot perzipieren können oder nicht. Insgesamt scheint es für die Bienen einfach lohnender zu sein, Blüten zu besuchen, deren Farbe sie eindeutig sehen können, da Experimente gezeigt haben, dass Bienen eindeutig länger brauchen, rote Blüten zu finden, als etwa blaue oder andersfärbige (Spaethe et al. 2001). Andererseits scheinen Honigbienen durchaus rote Blüten – auch Vertreter der „Mohngilde“ – häufiger zu besuchen als auch zu bestäuben, wenn die Konkurrenz durch andere Bestäuber, wie etwa auch Vertreter der Glaphyridae, noch nicht gegeben ist, obwohl typische „Bienenblüten“ normalerweise eher bilateralsymmetrisch sind, sowohl Pollen als auch Nektar als Belohnung anbieten und Farben aufweisen, die in einem Spektrum zwischen 300-600 nm Licht reflektieren (Keasar et al. 2008).

Insgesamt war die Anzahl der auswertbaren Bienenanflüge eher gering, da vergleichsweise wenige Bienen unterwegs waren und es teilweise schwierig war, den Bienen von Blüte zu Blüte zu folgen. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein

und dieselbe Biene mehrmals beobachtet wurde und so die Ergebnisse verfälscht hätten werden können, da Bienen sowohl angeborene als auch erlernte Farbpräferenzen aufweisen (Lunau & Maier 1995). Danach zeigen sie Farbkonstanz, besuchen also weitestgehend immer die selbe Farbe (u.a. Chittka et al. 1997; Neumeyer 1980,1981).

4. Zusammenfassung Diskussion Teil I und Teil II

Versuche zur Langwellen-Opsin-Gen-Sequenzierung von *Pygopleurus diffusus* Petrovitz und *Eulasia pareyssei* Brullé lieferten ein etwa 400 bp langes Fragment der kodierenden Region bei einem Vertreter von *Pygopleurus* sowie *Eulasia* und ~ 360 bp bei einem weiteren Vertreter von *Pygopleurus*. Versuche zur Amplifizierung weiterer Gen-Abschnitte blieben allerdings erfolglos.

Die sequenzierten Fragmente gruppierten in der NJ-Analyse durchweg mit Langwellen-Opsinen anderer Insekten zusammen. Ein Vergleich mit bekannten Spectral Tuning Positionen bei Schmetterlingen lieferte keine klaren Erkenntnisse, ob es sich bei den sequenzierten Opsinen um Rot-Rezeptoren handeln könnte, d.h. ob die spektrale Empfindlichkeit des Rezeptors in längerwellige verschoben ist. Positionen-spezifische Mutagenese-Experimente sowie eine Kombination dieser mit elektrophysiologischen Untersuchungen wären ein wichtiger Schritt, um dahingehend Aussagen treffen zu können.

Analysen der CO1-Region zu Barcoding-Zwecken ergaben eine eindeutige Einordnung aller sechs untersuchten Käfer in den Scarabaeiformes-Cluster. Es zeigte sich, dass die beiden analysierten Individuen von *Eulasia pareyssei* nicht überraschend mit *Eulasia* sp. clusterten, und diese innerhalb des Scarabaeiformes-Clusters am nächsten mit den vier untersuchten Vertretern von *Pygopleurus diffusus* verwandt zu sein scheinen, was aufgrund der Tatsache, dass sowohl *Eulasia* als auch *Pygopleurus* zur Familie Glaphyridae gehören, nicht weiter erstaunlich ist. Die vier untersuchten Individuen von *Pygopleurus diffusus* könnten eventuell unterschiedlichen (bisher unbeschriebenen) Unterart angehören.

Freilanduntersuchungen in Griechenland ergaben, dass sich die Farbverteilung von *Anemone pavonina*, einer der bevorzugten Blüten der Gattung *Pygopleurus*, mit der Höhe zusammenhängt, da die rote Form in tieferen Lagen und die violette/lila Form eher in höheren Lagen auftritt. Interessant ist, dass die rote Morphe tatsächlich nur im

Rotbereich reflektiert, während die weiße und die lila Morphe auch UV-Reflexion aufweisen. Käfer der Gattung *Pygopleurus* besuchten dabei signifikant häufiger die rote Form, während Honigbienen die lila Morphe bevorzugten. Versuche mit färbigen Bechern spiegelten ebenfalls diese Vorliebe von Vertretern der Gattung *Pygopleurus* für die Farbe Rot wieder, während die Gattung *Eulasia* eher von den gelben Bechern angezogen wurde.

Versucht man nun abschließend, Aussagen über mögliche Rotsichtigkeit der untersuchten Vertreter der Glaphyridae zu treffen, so gestaltet sich das als durchaus schwierig. Die Feldversuche – vor allem die Farbfallenversuche – legen den Schluss nahe, dass Vertreter der Gattung *Pygopleurus* durchaus Rot sehen könnten, weil sie diese Farbe bevorzugten. *Eulasia* dagegen zeigte überhaupt keine Präferenz für die roten Blütenmodelle. Allerdings war der Stichprobenumfang zu klein, um eindeutige Aussagen bei *Eulasia* machen zu können.

Literaturverzeichnis

- Arikawa K, Inokuma K and Eguchi E (1987). Pentachromatic visual system in a butterfly. *Naturwissenschaften* 74: 297-298.
- Arikawa K, Wakakuwa M, Qiu X, Kurasawa M, Stavenga DG (2005) Sexual dimorphism of short-wavelength photoreceptors in the small white butterfly, *Pieris rapae crucivora*. *The Journal of Neuroscience* 25: 5935–5942.
- Asenjo AB, Rim J, Oprian DD (1994) Molecular determinants of human red/green color discrimination. *Neuron* 12: 1131–1138.
- Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729-744.
- Ballard JWO, Rand DM (2005) The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 621-642.
- Bellingham J, Morris AG, Hunt DM (1998) The rhodopsin gene of the cuttlefish *Sepia officinalis*: Sequence and spectral tuning. *The Journal of Experimental Biology* 201: 2299- 2306.
- Bernard GD (1979) Red-absorbing visual pigments of butterflies. *Science* 203:1125–1127.
- Bernard GD, Remington CL (1991) Color vision in *Lycaena* butterflies: spectral tuning of receptor arrays in relation to behavioural ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 2783-2787.
- Bernhardt P (2000) Convergent evolution and adaptive radiation of beetle-pollinated angiosperms. *Plant Systematics and Evolution* 222: 293-320.
- Bojňanský V, Fargašová A (2007) Atlas of seeds and fruits of Central and East-European Flora. Dordrecht: Springer Verlag.

- Bowmaker JK, Govardovskii VI, Shukolyukov SA, Zueva LV, Hunt DM, Sideleva VG, Smirnova OG (1994) Visual pigments and the photic environment: the cottoid fish of Lake Baikal. *Vision Research* 34: 591–605.
- Briscoe AD (2000) Six opsins from the butterfly *Papilio glaucus*: molecular phylogenetic evidence for paralogous origins of red-sensitive visual pigments in insects. *Journal of Molecular Evolution* 51: 110–121.
- Briscoe AD (2001) Functional diversification of lepidopteran opsins following gene duplication. *Molecular Biology and Evolution* 18: 2270–2279.
- Briscoe AD, Chittka L (2001) The evolution of color vision in insects. *Annual Review of Entomology* 46: 471–510.
- Briscoe AD (2002) Homology modeling suggests a functional role for parallel amino acid substitutions between bee and butterfly red- and green-sensitive opsins. *Molecular Biology and Evolution* 19: 983–986.
- Briscoe AD, Bernard GD, Szeto AS, Nagy LM, White RH (2003) Not all butterfly eyes are created equal: Rhodopsin absorption spectra, molecular identification, and localization of ultraviolet-, blue-, and green-sensitive rhodopsin-encoding mRNAs in the retina of *Vanessa cardui*. *The Journal of Comparative Neurology* 458: 334–349.
- Briscoe AD, Bernard GD (2005) Eyeshine and spectral tuning of long wavelength-sensitive rhodopsins: no evidence for red-sensitive photoreceptors among five Nymphalini butterfly species. *The Journal of Experimental Biology* 208: 687–696.
- Britt SG, Feiler R, Kirschfeld K, Zuker CS (1993) Spectral tuning of rhodopsin and metarhodopsin *in vivo*. *Neuron* 11: 29–39.
- Brown BA, Clegg MT (1984) Influence of flower color polymorphism on genetic transmission in a natural population of the common morning glory, *Ipomoea purpurea*. *Evolution* 38: 796–803.
- Carleton KL, Kocher TD (2001) Cone opsin genes of African cichlid fishes: tuning spectral sensitivity by differential gene expression. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1540–1550.
- Castañeda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernández M, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113: 859–871.
- Chan T, Lee M, Sakmar TP (1992) Introduction of hydroxyl-bearing amino acids causes bathochromic spectral shifts in rhodopsin. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 9478–9480.
- Chang BS, Crandall KA, Carulli JP, Hartl DL (1995) Opsin phylogeny and evolution: a model for blue shifts in wavelength regulation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 31–43.
- Chang BSW, Ayers D, Smith WC, Pierce NE (1996) Cloning of the gene encoding honeybee long-wavelength rhodopsin: a new class of insect visual pigments. *Gene* 173: 215–219.
- Chase MR, Bennett RR, White RH (1997) Three opsin-encoding cDNAs from the compound eye of *Manduca sexta*. *The Journal of Experimental Biology* 200: 2469–2478.
- Chinen A, Hamaoka T, Yamada Y, Kawamura S (2003) Gene duplication and spectral diversification of cone visual pigments of zebrafish. *Genetics* 163: 663–675.

- Chittka L (1997) Bee color vision is optimal for coding flower color, but flower colors are not optimal for being coded—why? *Israel Journal of Plant Sciences* 45: 115–127.
- Chittka L, Waser NM (1997) Why red flowers are not invisible for bees. *Israel Journal of Plant Sciences* 45: 169–183.
- Chittka L, Gumbert A, Kunze J (1997) Foraging dynamics of bumble bees: correlates of movements within and between plant species. *Behavioral Ecology* 8: 239-249.
- Cooper-Driver GA (2001) Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry* 56: 229–236.
- Cowing JA, Poopalasundaram S, Wilkie SE, Bowmaker JK, Hunt DM (2002a) Spectral tuning and evolution of short wave-sensitive cone pigments in cottoid fish from Lake Baikal. *Biochemistry* 41: 6019-6025.
- Cowing JA, Poopalasundaram S, Wilkie SE, Robinson PR, Bowmaker JK, Hunt DM (2002b) The molecular mechanism for the spectral shifts between vertebrate ultraviolet- and violet-sensitive cone visual pigments. *Biochemical Journal* 367: 129-135.
- Crandall KA, Cronin TW (1997) The molecular evolution of visual pigments of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae). *Journal of Molecular Evolution* 45: 524–535.
- Cronin TW, Marshall NJ, Caldwell RL (2000) Spectral tuning and the visual ecology of mantis shrimps. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 355: 1263-1267.
- Crook DJ, Francese JA, Zylstra KE, Fraser I, Sawyer AJ, Bartels DW, Lance DR, Mastro VC (2009) Laboratory and Field Response of the Emerald Ash Borer (Coleoptera: Buprestidae), to Selected Regions of the Electromagnetic Spectrum. *Journal of Economic Entomology* 102: 2160-2169.
- Crowson RA (1981) *The Biology of Coleoptera*. London: Academic Press.
- Dafni A, Bernhardt P, Shmida A, Ivri Y, Greenbaum S, O'Toole C, Losito L (1990) Red bowl-shaped flowers: Convergence for beetle pollination in the Mediterranean region. *Israel Journal of Botany* 39: 81-92.
- Dafni A (1997) The response of *Amphicoma* spp. (Coleoptera; Glaphyridae) beetles to red models differing in area, shape, and symmetry. *Israel Journal of Plant Sciences* 45: 247-254.
- Dafni A, Potts SG (2004) The role of flower inclination, depth, and height in the preferences of a pollinating beetle (Coleoptera: Glaphyridae). *Journal of Insect Behavior* 17: 823–834.
- Daumer K (1956) Reizmetrische Untersuchungen des Farbensehens der Bienen. *Journal of Comparative Physiology* 38: 413-478.
- Daumer K (1958) Blumenfarben, wie sie die Bienen sehen. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* 41: 49-110.
- Deeb SS, Wakefield MJ, Tada T, Marotte L, Yokoyama S, Marshall Graves JA (2003) The cone visual pigment of an Australian marsupial, the Tammar wallaby (*Macropus eugenii*): sequence, spectral tuning and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 20: 1642-1649.
- Dieringer G, Cabrera RL, Lara M, Loya L, Resyes-Castillo P (1999) Beetle pollination and floral thermogenicity in *Magnolia tamaulipana* (Magnoliaceae). *International Journal of Plant Sciences* 160: 64-71.

- Dubitzky A (2005) Studies in phylogeny and biosystematics of bees: The bee genus *Andrena* (Andrenidae) and the tribe Anthophorini (Apidae) (Insecta: Hymenoptera: Apoidea). Hebertshausen: Dissertation, Eigenverlag.
- Dulai KS, Von Dornum M, Mollon JD, Hunt DM (1999) The Evolution of Trichromatic Color Vision by Opsin Gene Duplication in New World and Old World Primates. *Genome Research* 9: 629-638.
- Eguchi E, Watanabe K, Hariyama T, Yamamoto K (1982) A comparison of electrophysiologically determined spectral responses in 35 species of Lepidoptera. *Journal of Insect Physiology* 28: 675-682.
- Eguchi E, Nemoto A, Meyer-Rochow VB, Ohba N (1984) A comparative study of spectral sensitivity curves in three diurnal and eight nocturnal species of Japanese fireflies. *Journal of Insect Physiology* 30: 607-612.
- Ennos RA, Clegg MT (1983) Flower color variation in the morning glory, *Ipomoea purpurea*. *Journal of Heredity* 74: 247-250.
- Epling C, Dobzhansky T (1942) Genetics of natural populations. IV. Microgeographic races in *Linanthus parryae*. *Genetics* 27: 317-332.
- Epling C, Lewis H, Ball FM (1960) The breeding group and seed storage: a study in population dynamics. *Evolution* 14: 238-255.
- Epperson BK, Clegg MT (1986) Spatial-autocorrelation analysis of flower color polymorphisms within substructured populations of morning glory (*Ipomoea purpurea*). *The American Naturalist* 128: 840-858.
- Epperson BK, Clegg MT (1987) Frequency-dependent variation for outcrossing rate among flower-color morphs of *Ipomoea purpurea*. *Evolution* 41: 1302-1311.
- Fasick JJ, Robinson PR (1998) Mechanism of spectral tuning in the dolphin visual pigments. *Biochemistry* 37: 433-438.
- Fasick JJ, Robinson PR (2000) Spectral-tuning mechanisms of marine mammal rhodopsins and correlations with foraging depth. *Visual Neuroscience* 17: 781-788.
- Fasick JJ, Applebury ML, Oprian DD (2002) Spectral tuning in the mammalian short-wavelength sensitive cone pigments. *Biochemistry* 41: 6860-6865.
- Filipek S, Stenkamp RE, Teller DC, Palczewski K (2003) G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus. *Annual Review of Physiology* 65: 851-879.
- Frentiu FD, Bernard GD, Sison-Mangus MP, Van Zandt Brower A, Briscoe AD (2007a) Gene duplication is an evolutionary mechanism for expanding spectral diversity in the long wavelength photopigments of butterflies. *Molecular Biology and Evolution* 24: 2016-2028.
- Frentiu FD, Bernard GD, Cuevas CI, Sison-Mangus MP, Prudic KL, Briscoe AD (2007b) Adaptive evolution of color vision as seen through the eyes of butterflies. *PNAS* 104: 8634-8640.
- Frisch K von (1965) *Tanzsprache und Orientierung der Bienen*. Berlin u.a.: Springer Verlag.
- Fuller RC, Fleishman LJ, Leal M, Travis J, Loew E (2003) Intraspecific variation in retinal cone distribution in the bluefin killifish, *Lucania goodei*. *Journal of Comparative Physiology A* 189: 609-616.
- Fuller RC, Carleton KL, Fadool JM, Spady TC, Travis J (2004) Population variation in opsin expression in the bluefin killifish, *Lucania goodei*: a real-time PCR study. *Journal of Comparative Physiology A* 190:147-54.
- Gärtner W, Towner P (1995). Invertebrate visual pigments. *Photochemistry and Photobiology* 62: 1-16.

- Galen C, Kevan PG (1980) Scent and color, floral polymorphisms and pollination biology in *Polemonium viscosum* Nutt. *American Midland Naturalist* 104: 281-289.
- Gigord LDB, Macnair MR, Smithson A (2001) Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soo. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 6253–6255.
- Goldblatt P, Bernhardt P, Manning JC (1998) Pollination of petaloid geophytes by monkey beetles (Scarabaeidae: Rutelinae: Hopliini) in southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 215-230.
- Gottsberger G (1977) Some aspects of beetle pollination in the evolution of flowering plants. *Plant Systematics and Evolution Suppl.* 1: 211-226.
- Hajibabaei M, Singer GAC, Clare EL, Hebert PDN (2007) Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology* 5: 24.
- Hall MD, Hoon MA, Ryba NJP, Pottinger JDD, Keen JN, Saibil HR, Findlay JBC (1991) Molecular cloning and primary structure of squid (*Loligo forbesi*) rhodopsin, a phospholipase C-directed G-protein-linked receptor. *Biochemical Journal* 274: 35-40.
- Harvey DM (1971) Phenotypic variation in flower colour within the *Anemone coronaria* cultivars. *Annals of Botany* 35: 1-8.
- Hasselmann EM (1962) Über die relative spektrale Empfindlichkeit von Käfer- und Schmetterlingsaugen bei verschiedenen Helligkeiten. *Zoologische Jahrbücher (Physiologie)* 69: 537-576.
- Hazkani-Covo E, Zeller RM, Martin W (2010) Molecular poltergeists: mitochondrial DNA copies (numts) in sequenced nuclear genomes. *PLoS Genetics* 6: e1000834.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 313-321.
- Helversen O von (1972) Zur spektralen Unterscheidungsempfindlichkeit der Honigbiene. *Journal of Comparative Physiology* 80: 439-472.
- Hoffmann M, Tripathi N, Henz SR, Lindholm AK, Weigel D, Breden F, Dreyer C (2007) Opsin gene duplication and diversification in the guppy, a model for sexual selection. *Proceedings of the Royal Society B* 274: 33-42.
- Honig B, Greenberg AD, Dinur U, Ebrey TG (1976) Visual-pigment spectra: implications of the protonation of the retinal Schiff base. *Biochemistry* 15: 4593-4599.
- Hope AJ, Partridge JC, Dulai KS, Hunt DM (1997) Mechanisms of wavelength tuning in the rod opsins of deep-sea fishes. *Proceedings of the Royal Society B* 264: 155-163.
- Horovitz A, Zohary D (1966) Spontaneous variegation for perianth colour in wild *Anemone coronaria*. *Heredity* 21: 513-515.
- Horovitz A, Galil J, Zohary D (1975) Biological flora of Israel. 6. *Anemone coronaria* L. *Israel Journal of Botany* 24: 26-41.
- Horovitz A. (1976) Edaphic factors and flower colour distribution in the *Anemoneae* (*Ranunculaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 126: 239-242.
- Horovitz A (1991) The pollination syndrome of *Anemone coronaria* L.: An insect-biased mutualism. *Acta Horticulturae* 288: 283-287.

- Hsu R, Briscoe AD, Chang BSW, Pierce NE (2001) Molecular evolution of a long wavelength-sensitive opsin in mimetic *Heliconius* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 435-449.
- Hunt DM, Fitzgibbon J, Slobodyanyuk SJ, Bowmaker JK (1996) Spectral tuning and molecular evolution of rod visual pigments in the species flock of cottoid fish in Lake Baikal. *Vision Research* 36: 1217–1224.
- Hunt DM, Dulai KS, Partridge JC, Cottrill P, Bowmaker JK (2001) The molecular basis for spectral tuning of rod visual pigments in deep-sea fish. *Journal of Experimental Biology* 204: 3333–3344.
- Ichikawa T, Tateda H (1982) Distribution of color receptors in the larval eyes of four species of Lepidoptera. *Journal of Comparative Physiology* 149: 317-324.
- Imai H, Terakita A, Tachibanaki S, Imamoto Y, Yoshizawa T, Shichida Y (1997) Photochemical and Biochemical Properties of Chicken Blue-Sensitive Cone Visual Pigment. *Biochemistry* 36: 12773-12779.
- Irwin RE, Strauss SY, Storz S, Emerson A, Guibert G (2003) The role of herbivores in the maintenance of a flower color polymorphism in wild radish. *Ecology* 84: 1733-1743.
- Irwin RE, Strauss SY (2005) Flower color microevolution in wild radish: evolutionary response to pollinator-mediated selection. *American Naturalist* 165: 225–237.
- Ivri Y (1985) Observations and the pollination of red showy flowers. *Rotem* 14: 5-13 (auf Hebräisch).
- Jackowska M, Bao R, Liu Z, McDonald EC, Cook TA, Friedrich M (2007) Genomic and gene regulatory signatures of cryptozoic adaptation: Loss of blue sensitive photoreceptors through expansion of long wavelength-opsin expression in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Frontiers in Zoology* 4: 1-11.
- Jones KN, Reithel JS (2001) Pollinator-mediated selection on a flower color polymorphism in experimental populations of *Antirrhinum* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 88: 447-454.
- Keasar T, Shmida A, Zylbertal A (2008) Pollination ecology of the red *Anemone coronaria* (Ranunculaceae): Honeybees may select for early flowering. Discussion Paper # 491, Center for the Study of Rationality, The Hebrew University of Jerusalem (online unter http://ratio.huji.ac.il/dp_files/dp491.pdf).
- Keasar T, Harari AR, Sabatinelli G, Keith D, Dafni A, Shavit O, Zylbertal A, Shmida A (2009) Red anemone guild flowers as focal places for mating and feeding of Mediterranean glaphyrid beetles. Discussion Paper # 15, Center for the Study of Rationality, The Hebrew University of Jerusalem (online unter http://ratio.huji.ac.il/dp_files/dp515.pdf).
- Kelber A (1999) Ovipositing butterflies use a red receptor to see green. *Journal of Experimental Biology* 202, 2619-2630.
- Kelber A “Invertebrate colour vision”, in: Warrant E, Nilsson DE (Hg.) (2006) *Invertebrate vision*. Cambridge University Press: 250-290.
- Kinoshita M, Shimada N, Arikawa K (1999) Colour vision of the foraging swallowtail butterfly *Papilio xuthus*. *Journal of Experimental Biology* 202: 95-102.
- Kitamoto J, Sakamoto K, Ozaki K, Mishina Y, Arikawa K (1998) Two visual pigments in a single photoreceptor cell: identification and histological localization of three mRNAs encoding visual pigment opsins in the retina of the butterfly *Papilio xuthus*. *Journal of Experimental Biology* 201: 1255–1261.

- Kleinschmidt J, Harosi FI (1992) Anion sensitivity and spectral tuning of cone visual pigments *in situ*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 9181-9185.
- Kong J-M, Chia L-S, Goh N-K, Chia T-F, Brouillard R (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.
- Kouyama T, Murakami M (2008) Crystal structure of squid rhodopsin. *Nature* 453: 363-367.
- Kretz R (1979) A behavioural analysis of colour vision in the ant *Cataglyphis bicolor* (Formicidae, Hymenoptera). *Journal of Comparative Physiology A* 131: 217-33.
- Kühn A (1924) Versuche über das Unterscheidungsvermögen der Bienen und Fische für Spektrallichter. *Nachrichten der Gesellschaft für Wissenschaften* 1: 66-71.
- Labhart T (1986) The electrophysiology of photoreceptors in different eye regions of the desert ant, *Cataglyphis bicolor*. *Journal of Comparative Physiology A* 158: 1-7.
- Lack AJ, Kay QON (1987) Genetic structure, geneflow and reproductive ecology in sand-dune populations of *Polygala vulgaris*. *Journal of Ecology* 75: 259-276.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1998) *Prinzipien der Biochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Levin DA, Schmidt KP (1985) Dynamics of a hybrid zone in *Phlox*: an experimental demographic investigation. *American Journal of Botany* 72: 1404-1409.
- Lin S, Kochendoerfer G, Carroll K, Wang D, Mathies R, Sakmar T (1998) Mechanisms of spectral tuning in blue cone pigments. *Journal of Biological Chemistry* 273: 24583-24591.
- Lunau K, Maier EJ (1995) Innate colour preferences of flower visitors. *Journal of Comparative Physiology A* 177: 1-19.
- Makino CL, Groesbeek M, Lugtenburg J, Baylor DA (1999) Spectral tuning in salamander visual pigments studied with hiydroretinal chromophores. *Biophysical Journal* 77: 1024-1035.
- Maksimovic S, Cook TA, Buschbeck EK (2009) Spatial distribution of opsin-encoding mRNAs in the tiered larval retinas of the sunburst diving beetle *Thermonectus marmoratus* (Coleoptera: Dytiscidae). *Journal of Experimental Biology* 212: 3781-3794.
- Mardulyn P, Cameron SA (1999) The major opsin in bees (Insecta: Hymenoptera): A promising nuclear gene for higher level phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 168-176.
- Martinez-Harms J, Vorobyev M, Schorn J, Shmida A, Menzel R (unveröffentlicht) Color vision of Glaphyrid beetles and their flowers colors.
- Matic T (1983) Electrical inhibition in the retina of the butterfly *Papilio*. I. Four spectral types of photoreceptors. *Journal of Comparative Physiology* 152: 169-182.
- Matsumoto Y, Fukamachi S, Mitani H, Kawamura S (2006) Functional characterization of visual opsin repertoire in Medaka (*Oryzias latipes*). *Gene* 371: 268-278.
- Mayer C, Soka G, Picker M (2006) The importance of monkey beetle (Scarabaeidae: Hopliini) pollination for Aizoaceae and Asteraceae in grazed and ungrazed areas at Paulshoek, Succulent Karoo, South Africa. *Journal of Insect Conservation* 10: 323-333.
- Meinertzhagen IA, Menzel R, Kahle G (1983) The identification of spectral receptor types in the retina and lamina of the dragonfly *Sympetrum rubicundulum*. *Journal of Comparative Physiology* 151: 295-310.

- Menzel R., Shmida A (1993) The ecology of flower colours and the natural colour vision systems of insect pollinators: The Israeli flora as a study case. *Biological Reviews* 68: 81-120.
- Merbs SL, Nathans J (1992) Absorption spectra of human cone pigments. *Nature* 356: 433-435.
- Merbs SL, Nathans J (1993) Role of hydroxyl-bearing amino acids in differentially tuning the absorption spectra of the human red and green cone pigments. *Photochemistry and Photobiology* 58: 706-710.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology* 3: e422.
- Monaghan MT, Balke M, Gregory TR, Vogler AP (2005) DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1925-1933.
- Nathans J (1987) Molecular biology of visual pigments. *Annual Review of Neuroscience* 10: 163-194.
- Nathans J (1999) The evolution and physiology of human color vision: Insights from molecular genetic studies of visual pigments. *Neuron* 24: 299-312.
- Neitz M, Neitz J, Jacobs GH (1991) Spectral tuning of pigments underlying red-green color vision. *Science* 252: 971-974.
- Neri M, Vanni S, Tavernelli I, Rothlisberger U (2010) Role of aggregation in rhodopsin signal transduction. *Biochemistry* 49: 4827-4832.
- Neumeyer C (1980) Simultaneous color contrast in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A* 139: 165-176.
- Neumeyer C (1981) Chromatic adaptation in the honey bee: successive color contrast and color constancy. *Journal of Comparative Physiology A* 144: 543-553.
- Oba Y, Kainuma T (2009) Diel changes in the expression of long wavelength-sensitive and ultraviolet-sensitive opsin genes in the Japanese firefly, *Luciola cruciata*. *Gene* 436: 66-70.
- Osorio D, Vorobyev M (2005) Photoreceptor spectral sensitivities in terrestrial animals: adaptations for luminance and colour vision. *Proceedings of the Royal Society B* 272: 1745-1752.
- Pamilo P, Viljakainen L, Vihavainen A (2007) Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1340-1346.
- Pamminger T (2008) Bumblebee vision: Modification of the visual system in terrestrial habitats. Wien: Diplomarbeit, Eigenverlag.
- Parry JW, Poopalasundaram S, Bowmaker JK, Hunt DM (2004) A novel amino acid substitution is responsible for spectral tuning in a rodent violet-sensitive visual pigment. *Biochemistry* 43: 8014-8020.
- Paul R, Steiner A, Gemperlein R (1986) Spectral sensitivity of *Calliphora erythrocephala* and other insect species studied with Fourier interferometric stimulation (FIS). *Journal of Comparative Physiology* 158: 669-680.
- Peitsch D, Feitz A, Hertel H, de Souza J, Ventura DF, Menzel R (1992) The spectral input systems of hymenopteran insects and their receptor-based colour vision. *Journal of Comparative Physiology A* 170: 23-40.
- Pereira F, Carneiro J, Amorim A (2008) Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Patents on DNA and Gene Sequences* 2: 187-200.
- Pichaud F, Briscoe A, Desplan C (1999) Evolution of color vision. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 622-627.

- Picker MD, Midgley JJ (1996) Pollination by monkey beetles (Coleoptera: Scarabaeidae: Hopliini): flower and colour preferences. *African Entomology* 4: 7-14.
- Proctor M, Yeo P (1973) *The Pollination of Flowers*. London: Collins.
- Qiu X, Arikawa, K (2003a) The photoreceptor localization confirms the spectral heterogeneity of ommatidia in the male small white butterfly, *Pieris rapae crucivora*. *Journal of Comparative Physiology A* 189: 81-88.
- Qiu X, Arikawa K (2003b) Polymorphism of red receptors: sensitivity spectra of proximal photoreceptors in the small white butterfly, *Pieris rapae crucivora*. *Journal of Experimental Biology* 206: 2787-2793.
- Raupach MJ, Astrin JA, Hannig K, Peters MK, Stoeckle MY, Wägele J-W (2010) Molecular species identification of Central European ground beetles (Coleoptera: Carabidae) using nuclear rDNA expansion segments and DNA barcodes. *Frontiers in Zoology* 7: 26.
- Raven PH (1972) Why are bird-visited flowers predominantly red? *Evolution* 26: 674.
- Saito N, Toki K, Moriyama H, Shigihara A, Honda T (2002) Acylated anthocyanins from the blue-violet flowers of *Anemone coronaria*. *Phytochemistry* 60: 365-373.
- Sakai S, Kuniyasu M, Ymoto T, Kato M, Inoue T (1999) Beetle pollination of *Shorea parvifolia* (Section *Mutica*, Dipterocarpaceae) in a general flowering period in Sarawak, Malaysia. *American Journal of Botany* 86: 62-69.
- Salcedo E, Farrell DM, Zheng L, Phistry M, Bagg EE, Britt SG (2009) The green-absorbing *Drosophila* Rh6 visual pigment contains a blue-shifting amino acid substitution that is conserved in vertebrates. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 5717-5722.
- Schemske DW, Bierzychudek P (2001) Perspective: evolution of flower color in the desert annual *Linanthus parryae*: Wright revisited. *Evolution* 55: 1269-1282.
- Schemske DW, Bierzychudek P (2007) Spatial differentiation for flower color in the desert annual *Linanthus parryae*: Was Wright right? *Evolution* 61: 2528-2543.
- Schönfelder I, Schönfelder P (2002) *Kosmos Atlas Mittelmeer- und Kanarenflora*. Stuttgart: Franck-Kosmos Verlags-GmbH & Co.
- Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA (2006) 3' End cDNA amplification using classic RACE. *Nature Protocols* 1: 2742-2745.
- Seki T, Vogt K (1998) Evolutionary aspects of the diversity of visual pigment chromophores in the class Insecta. *Comparative Biochemistry and Physiology* 119: 53-64.
- Shi Y, Radlwimmer FB, Yokoyama S (2001) Molecular genetics and the evolution of ultraviolet vision in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 11731-11736.
- Shi Y, Yokoyama S (2003) Molecular analysis of the evolutionary significance of ultraviolet vision in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 8308-8313.
- Shyue S-K, Boissinot S, Schneider H, Sampaio I, Schneider MP, Abee CR, Williams L, Hewett-Emmett D, Sperling HG, Cowing JA, Dulai KS, Hunt DM, Li W-H (1998) Molecular genetics of spectral tuning in New World monkey color vision. *Journal of Molecular Evolution* 46: 697-702.
- Smith WC, Goldsmith TH (1990) Phyletic aspects of the distribution of 3-hydroxyretinal in the Class Insecta. *Journal of Molecular Evolution* 30: 72-84.
- Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA (2008) Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial

- pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 13486-13491.
- Spady TC, Parry JW, Robinson PR, Hunt DM, Bowmaker JK, Carleton KL (2006) Evolution of the Cichlid Visual Palette through Ontogenetic Subfunctionalization of the Opsin Gene Arrays. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1538-1547.
- Spaethe J, Tautz J, Chittka L (2001) Visual constraints in foraging bumblebees: Flower size and color affect search time and flight behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 3898–3903.
- Spaethe J, Briscoe AD (2004) Early duplication and functional diversification of the opsin gene family in insects. *Molecular Biology and Evolution* 21: 1583–1594.
- Stanton ML (1987) Reproductive biology of petal color variants of wild populations of *Raphanus sativus* L.: I. Pollinator response to color morphs. *American Journal of Botany* 74: 176-185.
- Stavenga DG, Arikawa K (2006) Evolution of color and vision of butterflies. *Arthropod Structure & Development* 35: 307-318.
- Steiner A, Rudiger P, Gemperlein R (1987) Retinal receptor types in *Aglais urticae* and *Pieris brassicae* (Lepidoptera), revealed by analysis of the electroretinogram obtained with Fourier interferometric stimulation (FIS). *Journal of Comparative Physiology A* 160: 247-258.
- Sun H, Macke J, Nathans J (1997) Mechanisms of spectral tuning in the mouse green cone pigment. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 8860-8865.
- SurrIDGE AK, Osorio D, Mundy NI (2003) Evolution and selection of trichromatic vision in primates. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 198–204.
- Takahashi Y, Ebrey TG (2003) Molecular basis of spectral tuning in the newt short wavelength sensitive visual pigment. *Biochemistry* 42: 6025-6034.
- Toki K, Saito N, Shigihara A, Honda T (2001) Anthocyanins from the scarlet flowers of *Anemone coronaria*. *Phytochemistry* 56: 711-715.
- Townson SM, Chang BSW, Salcedo E, Chadwell LV, Pierce NE, Britt SG (1998) Honeybee blue- and ultraviolet-sensitive opsins: cloning, heterologous expression in *Drosophila*, and physiological characterization. *The Journal of Neuroscience* 18: 2412–2422.
- Wakakuwa M, Stavenga DG, Kurasawa M, Arikawa K (2004) A unique visual pigment expressed in green, red and deep-red receptors in the eye of the small white butterfly, *Pieris rapae crucivora*. *The Journal of Experimental Biology* 207: 2803-2810.
- Wald G (1968) The molecular basis of visual excitation. *Nature* 219: 800–807.
- Waser NM, Price MV (1981) Pollinator choice and stabilizing selection for flower color in *Delphinium nelsonii*. *Evolution* 35: 376–390.
- Waser NM, Price MV (1983) Pollinator behaviour and natural selection for flower colour in *Delphinium nelsonii*. *Nature* 302: 422-424.
- Waugh J (2007) DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays* 29: 188-197.
- Wiemers M, Fiedler K (2007) Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology* 4: 8.
- Wilkie SE, Robinson PR, Cronin TW, Poopalasundaram S, Bowmaker JK, Hunt DM (2000) Spectral tuning of avian violet- and ultraviolet-sensitive visual pigments. *Biochemistry* 39: 7895–7901.

- Williams AJ, Hunt DM, Bowmaker JK, Mollon JD (1992) The polymorphic photopigments of the marmoset: spectral tuning and genetic basis. *The EMBO Journal* 11: 2039-2045.
- Wittmann D, Radtke R, Cure J, Schifino-Wittmann MT (1990) Coevolved reproductive strategies in the oligolectic bee *Callonychium petuniae* (Apoidea, Andrenidae) and three purple flowered *Petunia* species (Solanaceae) in southern Brazil. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 28:157–65.
- Wright S (1943) An analysis of local variability of flower color in *Linanthus parryae*. *Genetics* 28: 139–156.
- Wu M (2008) Evolutionary analysis of opsin genes in *Tribolium* and related darkling beetles. ETD Collection for Wayne State University. Paper AAI1456768 (Abstract online unter <http://digitalcommons.wayne.edu/dissertations/AAI1456768>).
- Yang EC, Osorio D (1991) Spectral sensitivities of photoreceptors and lamina monopolar cells in the dragonfly, *Hemicordulia tau*. *Journal of Comparative Physiology A* 169: 663-669.
- Yang EC, Osorio D (1996) Spectral responses and chromatic processing in the dragonfly lamina. *Journal of Comparative Physiology* 178: 543-550.
- Yinon U (1970) The visual mechanisms of *Tenebrio molitor*: some aspects of the spectral response. *The Journal of Experimental Biology* 53: 221-229.
- Yokoyama R, Yokoyama S (1990) Convergent evolution of the red- and green-like visual pigment genes in fish, *Astyanax fasciatus*, and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 9315–9318.
- Yokoyama S (1994) Gene duplications and evolution of the short wavelength-sensitive visual pigments in vertebrates. *Molecular Biology and Evolution* 11: 32–39.
- Yokoyama S, Radlwimmer R (1998) The “five-sites” rule and the evolution of red and green color vision in mammals. *Molecular Biology and Evolution* 15: 560–567.
- Yokoyama S, Radlwimmer FB (1999) The molecular genetics of red and green color vision in mammals. *Genetics* 153: 919–932.
- Yokoyama S, Zhang H, Radlwimmer FB, Blow NS (1999) Adaptive evolution of color vision of the Comoran coelacanth (*Latimeria chalumnae*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 6279–6284.
- Yokoyama S, Shi Y (2000) Genetics and evolution of ultraviolet vision in vertebrates. *FEBS Letters* 486: 167–172.
- Yokoyama S, Radlwimmer FB (2001) The molecular genetics and evolution of red and green color vision in vertebrates. *Genetics* 158: 1697–1710.
- Yokoyama S, Starmer WT, Takahashi Y, Tada T (2006) Tertiary structure and spectral tuning of UV and violet pigments in vertebrates. *Gene* 365: 95-103.
- Yokoyama S, Takenaka N, Blow N (2007) A novel spectral tuning in the short wavelength-sensitive (SWS1 and SWS2) pigments of bluefin killifish (*Lucania goodei*). *Gene* 396: 196-202.
- Zhukovsky EA, Oprian DD (1989) Effect of carboxylic acid side chains on the absorption maximum of visual pigments. *Science* 246: 928-930.

Anhang

Tab.1: Die nicht-funktionierenden Primer. Angeführt sind die Bezeichnung des jeweiligen Primers, die Sequenz in 5'-3'-Richtung, die Position in Basenpaaren bezogen auf die mRNA von *Tribolium castaneum* sowie die Herkunft des jeweiligen Primers. *Wobble*-Positionen sind grün markiert.

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5'-3')	Position mRNA [bp]	Herkunft
<i>LWRh for</i>	ATTTGCTATTAYGARACNTGGG	358-380	Mardulyn & Cameron (1999)
<i>LWRh rev</i>	ATATGGAGTCCANGCCATRAAC CA	883-906	Mardulyn & Cameron (1999)
<i>80 (for)</i>	GAACARGCWAAARAATGA	778-791	u.a. Briscoe 2001; Briscoe et al. 2003; Briscoe & Bernard 2005; Chang et al. 1996; Spaethe & Briscoe 2004
<i>OPSRD (rev)</i>	CCRTANACRATNGGRTRTA	1000-1019	u.a. Briscoe 2001; Briscoe et al. 2003; Briscoe & Bernard 2005; Chang et al. 1996; Spaethe & Briscoe 2004
<i>Beetle LW1 for</i>	TMACMGTYGTNGAYAAARGT	71-89	TcRhR-3F, Jackowska et al. (2007), Alignierung mit <i>Tribolium</i> , <i>Luciola</i> , <i>Thermonectus</i>
<i>Beetle LW3 for</i>	ATGACNGCNTGYGGWACKGA	598-617	Oba LW2f, Oba & Kainuma (2009), Alignierung mit <i>Tribolium</i> , <i>Luciola</i> , <i>Thermonectus</i>
<i>Beetle LW4 for</i>	TYCCRCCMATGAACCCSCTMTG	134-155	Designed mit „Primer Select 8.0.2“ (Lasergene, DNASTar) ausgehend von <i>Tribolium</i> ; anschließend Alignierung mit <i>Tribolium</i> und <i>Luciola</i> → Einfügen von wobble-Positionen
<i>Beetle LW5 for</i>	AACCCSCTMTGGCACGGYMTT CT	145-167	Designed mit „Primer Select 8.0.2“ (Lasergene, DNASTar) ausgehend von <i>Tribolium</i> ; anschließend Alignierung mit <i>Tribolium</i> und <i>Luciola</i> → Einfügen von wobble-Positionen
<i>Beetle LW8 for</i>	CAAGCAAAGAAAATGAACG	760-778	manuell designed ausgehend von Alignment von <i>Tribolium</i> und <i>Luciola</i>
<i>Beetle LW1 rev</i>	ACNGCRTTRGCVTTNGCRAA	958-977	Oba LW3r, Oba & Kainuma (2009), Alignierung mit <i>Tribolium</i> , <i>Luciola</i> , <i>Thermonectus</i>
<i>Beetle LW2 rev</i>	GTCATGTTRCCTTCTGGSACGT A	580-602	Reverse Complement von <i>Beetle LW2 f</i>
<i>Beetle LW3 rev</i>	TCMGTTCCRCASGCSGTCAT	598-617	Reverse Complement von <i>Beetle LW3 f</i>

<i>Beetle LW7 rev</i>	CACACCAACGAYGGGAAYTTC TT	1033- 1055	händisch designed ausgehend von Alignment von <i>Tribolium</i> und <i>Luciola</i> sequenzspezifisch bzgl. Alignment eigener Sequenzen von Individuen A und C
<i>Beetle LW8 rev</i>	AATCGGTACCACAAGCTGTCA	599-619	sequenzspezifisch bzgl. Alignment eigener Sequenzen von Individuen A und C
<i>Beetle LW9(a) for</i>	CCGATAGTCTATGCAATTAGTC	985-1006	sequenzspezifisch bzgl. Alignment eigener Sequenzen von Individuen A und C
<i>Beetle LW10(i)for</i>	GTCATCCAAAATACAGACAAG C	1004- 1025	sequenzspezifisch bzgl. Alignment eigener Sequenzen von Individuen A und C
<i>Scotto Q_o</i>	CCAGTGAGCAGAGTGACG	-	Scotto-Lavino et al. (2006); Verwendung für 3'RACE
<i>Scotto Q_i</i>	GAGGACTCGAGCTCAAGC	-	Scotto-Lavino et al. (2006); Verwendung für 3'RACE
<i>Scotto Q_t</i>	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGG ACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTT TTTTTTTT	-	Scotto-Lavino et al. (2006); Verwendung für 3'RACE

Tab.2: Abkürzungen und Eigenschaften der einzelnen Aminosäure. Die nomenklatorische Einteilung bezieht sich auf Lehninger et al. (1998).

Abkürzung	Name	Eigenschaft
G (Gly)	Glycin	Unpolar, aliphatische Seitenketten
A (Ala)	Alanin	Unpolar, aliphatische Seitenketten
V (Val)	Valin	Unpolar, aliphatische Seitenketten
L (Leu)	Leucin	Unpolar, aliphatische Seitenketten
I (Ile)	Isoleucin	Unpolar, aliphatische Seitenketten
P (Pro)	Prolin	Unpolar, aliphatische Seitenketten
F (Phe)	Phenylalanin	Aromatische Seitenketten
W (Trp)	Tryptophan	Aromatische Seitenketten
Y (Tyr)	Tyrosin	Aromatische Seitenketten
S (Ser)	Serin	Polar, ungeladene Seitenketten
T (Thr)	Threonin	Polar, ungeladene Seitenketten
C (Cys)	Cystein	Polar, ungeladene Seitenketten
M (Met)	Methionin	Polar, ungeladene Seitenketten
N (Asn)	Asparagin	Polar, ungeladene Seitenketten
Q (Gln)	Glutamin	Polar, ungeladene Seitenketten
D (Asp)	Asparaginsäure	Negativ Geladene Seitenketten
E (Glu)	Glutaminsäure	Negativ Geladene Seitenketten
K (Lys)	Lysin	Positiv geladene Seitenketten
R (Arg)	Arginin	Positiv geladene Seitenketten
H (His)	Histidin	Positiv geladene Seitenketten

Tab.3: Vergleichssequenzen für das Alignment zur Überprüfung von Spectral Tuning Positionen.
 Angeführt sind die jeweiligen Taxa sowie deren jeweilige Genebank Accession Number.

Taxon	GeneBank Accession Number
<i>Bos taurus</i> (Bovine) Rhodopsin	NM_001162519.1
<i>Homo sapiens</i> Grün (MW)	NM_000513.2
<i>Homo sapiens</i> Rot (LW)	NM_020061.4
<i>Bombus impatiens</i> LWRh1	AY485302.1
<i>Papilio glaucus</i> Rh1	AF077189.1
<i>Papilio glaucus</i> Rh3	AF067080.1
<i>Heliconius sara</i> Rot	AF126753
<i>Drosophila melanogaster</i> Rh1	K02315.1
<i>Drosophila melanogaster</i> Rh2	M12896.1
<i>Drosophila melanogaster</i> Rh3	M17718.1
<i>Drosophila melanogaster</i> Rh4	NM_057353.3
<i>Drosophila melanogaster</i> Rh5	U67905.1
<i>Drosophila melanogaster</i> Rh6	Z86118.1


```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Bovine Rhodopsin      MNGTEGPNFYVPSN~KTGVVRSPPFEAP~QYYLAEPWFQSMLAAYMFLMLGFPINFL
Papilio glaucus Rh1   MALDSLDPAAATFGHAWACKMEAYGSNQTVIDQVLEPEMLHLID.HWY.FPPMN.LWHGL.GFVIAGV.GFISLSG.GM
Papilio glaucus Rh3   MALDYLNTGAAKMGTFW.CQMSAYGANQTVVD.VLPEMLHLID.HWY.FPPMN.LWYGL.GFTIAC.AITSITG.AM
Heliconius sara Rot   ~XH.FPPMN.LWHGL.GFVIGV.GFISVTG.GM
A
C
E
Homo sapiens Grün (MW)  ~MAQQWSLQRLA.RHPQDS.EDSTQSSIFTYTNSNST.G...G.~N.HI.PR.VYHLTSVW.IFVVIASVFT.G.
Homo sapiens Rot (LW)  ~MAQQWSLQRLA.RHPQDS.EDSTQSSIFTYTNSNST.G...G.~N.HI.PR.VYHLTSVW.IFVVIASVFT.G.
Bombus impatiens LWRh1  ~Y.FPPLN.MWHGI.GFVIGV.GFISVSG.GM
Drosophila melanogaster Rh1  ~MES~FAVAAQLGPHFA.L.~NGSVVD.VTPDMAHLIS.YWN.FPAMD.IWAKI.T...IMIG.ISWCG.GV
Drosophila melanogaster Rh2  ~MERSHLPETPPFDLAHSGPRFQAQ.SGNGSVLDNVLPMMAHLVN.YWSRFAPMD.MMSKI.GLFTLAIMIISCCG.GV
Drosophila melanogaster Rh3  MESGNVSSSLFGNVSTALR.EARLS~AETRLLGWNVPEELRHIPHEHLT.PEPPESMNYL.GTLYIFFTLMMLG.G.
Drosophila melanogaster Rh4  MEP~LCNASEPPLR.EARSSGNDLQFLGWNVPPDQIQYIPEHLWTLQLEPPASMHY..GVFYIF.FCASTVG.GM
Drosophila melanogaster Rh5  ~MHINGPS.PQAYVNDLSLGDGVSFPPGHGYPAEYQHMVAHWRFRE.PIYHAGFYIAPIV.MLSSIFG.G.
Drosophila melanogaster Rh6  ~ASLHP.S.AYMRDGRNLSLAESVPAEIMHMVD.YWY.WPPL.MW.GIIGFVIAI.GTMSLAG..I

      90      100      110      120      130      140      150      160
Bovine Rhodopsin      TLYVTVQHKLRTPLNYYILLNAVADLFMVFQGGFTTLLYTSLHGYPVFGPTGCNLEGGFATLGGELIWSLVVLAIERIV
Papilio glaucus Rh1   VI.IFTTT.T.K..S.LLV...S.FL.MTCMAPPLVNV.Y.ETW...LA.A.YAAAGS.F.T.SI.TMTMI.FD..N
Papilio glaucus Rh3   VI.IFTTT.N.K..S.LLV...S.FL.MACMAPPLIIN.YNETW...LF.AIYACGGS.Y.TVSI.TMTAI.FD..N
Heliconius sara Rot   VV.IFTTT.S.K..S.ILVV...FS.FL.M.MMAPPVINCYNETW...LA.Q.YACAGS.Y.CVSI.TMTMI.FD..N
A
C
E
Homo sapiens Grün (MW)  V.AA.MKF...H...W.V.....AETVIAS.ISVNVQVY...L.HPM.V...YTVS.C.ITG...AIISW..WM
Homo sapiens Rot (LW)  V.AA.MKF...H...W.V.....AETVIAS.ISVNVQVS...L.HPM.V...YTVS.C.ITG...AIISW..WL
Bombus impatiens LWRh1  VV.IFLST.S...S.LFVI...IS.FL.M.CMSPPMVINCYYETW.L.LF.QIYAMLGS.F.CGSI.TMTMI.FD..N
Drosophila melanogaster Rh1  VI.IFATT.S...A.LLVI...IS.FGIMITNTPMGINLYFETW.L.MM.DIYAGLGSAP.CSSI.MCMISLD..Q
Drosophila melanogaster Rh2  VV.IFGGT.S...A.LLV...FS.FC.MASQSPVMINIFYETW.L.LW.DIYAGCGS.F.CVSI.MCMI.FD..N
Drosophila melanogaster Rh3  VIW.FSAA.S...S.ILVI...FC.FM.MVK~TPIFI.N.F.QGYAL.HL..QIF.IIGSYT.IA.GATNAFI.YD.FN
Drosophila melanogaster Rh4  VIWIFSTS.S...S.MFV...F..I.CLK~APIFI.N.F.RG.AL.N.W.QIFASIGSYS.IG.GMPNAAIGYD..N
Drosophila melanogaster Rh5  VIWIFSTS.S...S.LLI...IF...CTN~MPHY.INATV..I.G.DL..DIYALNGGIS.MG.SITNAFI.FD..K
Drosophila melanogaster Rh6  VM.IFTSS.G...S.MFVV...FS.FM.M.TM.PPVVNLNGFY.TWIM..FL.E.Y.M.GS.F.CVSI..MTLL.YD..C

      170      180      190      200      210      220      230      240
Bovine Rhodopsin      VVCKPMSNFRFGENHAIMGVAFVWVWALACAAPPLVG~WSRYIPEGMCCSCGIDYTPHEETNNESEFVIYMFVVFHFIPL
Papilio glaucus Rh1   .IV.GIAAKPMTN.G.LLRILAI..SS..WVVA.MF.~N..V...NMTA..T..LNKDWFPS~R.YIVAYAFICYFT..
Papilio glaucus Rh3   .IV.GIAAKPMSI.G.LLRILAI.LSS..WVVA.IF.~N..V...NMTV..T..LSKDMLS~R.YI.AYA.FCYFL..
Heliconius sara Rot   .IV.GIAAKPMTI.G.LLR.FGI.AFS..WTIA..F.~G..V...NMTA..T..FDQSFNS~R.YILLYSIACYA..
A
C
E

```

```

Homo sapiens Grün (MW)      ....FG.V..DAKL..V.I..S.IW.AVWT...IF...W.H.LKT...P.VFSGSSYPGVQ.YM.VLM.TCC.T..
Homo sapiens Rot (LW)      ....FG.V..DAKL..V.I..S.IWSAVWT...IF...W.H.LKT...P.VFSGSSYPGVQ.YM.VLM.TCC...
Bombus impatiens LWRh1     .IV.GL.GKPLTI.G.LLRILGI.LFS.IWTIA.MF...N..V...NMTA..T..FSRDIVS~V.YILLYSIWVYFF..
Drosophila melanogaster Rh1 .IV.G.AGRPMTIPL.LGKI.YI.F.SSIWCLA.AF...V...NLT...LERDWNP~R.YL.FYSIFVYV...
Drosophila melanogaster Rh2 .IV.GINGTPTMTIKTS..KIL.I.M..VPWVTM..I...A.V...NLT.A.S...M.RMWNP~R.YL.TYSLFVYV...
Drosophila melanogaster Rh3 .ITR..EGK-MTHGK..AMIT.IYMY.TPWVVCYET.F.G.FV...YLT..TF..L.DNFD..~RL..ACI.FFS.VC.T
Drosophila melanogaster Rh4 .IT...NRN-MTFPK.VIMNIII.LYCTPWVVL...TQF.D.FV...YLT..SF..LSDNFD..~RL..GTI.FFS.VC.T
Drosophila melanogaster Rh5 .TISN.IDGR-LSYGGIVLLIL...LW.TPFSVL...FQI.G..Q...FLT.T.SF..L.NTD.N~RL..RTI..WSVY..M
Drosophila melanogaster Rh6 .IV.G.ARKPLTATA.VLRIMVV.TICG.W.LM..F..N..V...NMTA..T..FAKDWNN~R.YI.VYSLVWVYLT..

      250      260      270      280      290      300      310      320
Bovine Rhodopsin          .IVIFFCYGQLVFTVKEAAAQQQESATIQ...KAEKEVTRMVIIMVIAFLICWLPYAGVAFYIPTHQGS
Papilio glaucus Rh1       AL.IYS.FFIIQA.AAHERAMR.Q.KKMNVASLRSSAAANT~S..CKLAKVALMTISLWFMA.T..LVIN.TGIF~ETAP
Papilio glaucus Rh3       GL.IYS.WFIIQA.AAHEKAMR.Q.KKMNVASLRSSDAANT~S..CKLAKVALMTISLWFMA.T..LVIN.AGVF~ETAP
Heliconius sara Rot       FL.IYS.WFIIQA.AAHEKAMR.Q.KKMNVASLRSSDAANT~S..CKLAKVALMTISLWFMA.T..LVINYAGIFKMTMX
A                           FT.IYS.WFI.QA.AAHEKAMR.Q.KKMNVASLRSSDANDT~S..FKLAKVALMTISLWFMA.T..LITNYIGIF~ETAN
C                           FT.IYS.WFI.QA.AAHEKAMR.Q.KKMNVASLRSSDANET~S..FKLAKVALMTISLWFMA.T..LITNYIGIF~ETAN
E                           FT.IYS.WFI.QA.AAHEKAMR.Q.KKMNVASLRSSDTNET~S..CKLAKVALVTISLWFMA.T..LITNYIGIF~ETAN
Homo sapiens Grün (MW)    SI.VL..L.VWLAIRAV.K..K..ES...~VV..L..CF..G...FF.CFAAANP.YP
Homo sapiens Rot (LW)     AI.ML..L.VWLAIRAV.K..K..ES...~VV..IP.YCV..G...TFF.CFAAANP.YA
Bombus impatiens LWRh1    FL.IWS.WYIIQA.AAHEKNMR.Q.KKMNVASLRSSENQNT~SX..CKLAKVALMTISLWFMA.T..LVINWSGIF~SLVK
Drosophila melanogaster Rh1 .FL.CYS.WFIIQA.AAHEKAMR.Q.KKMNVKSLRSSEDA EK~S..CKLAKVALVTISLWFMA.T..LVINCMGLF~KFBG
Drosophila melanogaster Rh2 .FL.CYS.WFIIQA.AAHEKAMR.Q.KKMNVKSLRSSEDCDK~S..CKLAKVALVTISLWFMA.T..LVICYFGLF~KIDG
Drosophila melanogaster Rh3 .TM.TYY.S.I.GH.FSHEKALRDQ.KKMNVESLRSNVDKNET..IRIAKAA.TICPL.FCS.T..GVMSLIGAFGDKL
Drosophila melanogaster Rh4 .LM.LYY.S.I.GH.FSHEKALR.Q.KKMNVESLRSNVDKSKET..IRIAKAA.TICPL.FVS.T..GVMSLIGAFGDK.L
Drosophila melanogaster Rh5 .TM.LVS.YK.FTH.RVHEKMLA.Q.KKMNVKSLSANADNMSV.LRIAKAAL.IYML.ILA.T..SV..LIGCFGEQQL
Drosophila melanogaster Rh6 .LT.I.S.WHIMKA.AAHEKAMR.Q.KKMNVASLRNSEADKSKAI..TKLAKVALVTISLWFMA.T..TIINYAGIF~ESMH

      330      340      350      360      370      380      390
Bovine Rhodopsin          FGPIFMTIPAFFAKTSAVYNPVIYIMNKQFRNCMVTTLCGGKNPLGDDDEASTVSKTETSQVAPA*
Papilio glaucus Rh1       IS.LGTIWGSV...AN...IV.GISHPKY.AALYQRFPSLAC-QPAADDN.SQASGK.TVCEEKPSA*
Papilio glaucus Rh3       IS.VSTIWGSV...AN...IV.GISHPKY.AALYQRFPSLAC-QPSPEDE.GS.ASGN.AVCEEKPPA*
Heliconius sara Rot       IT.MGSIWCSV...A.S...IV.AIS~
A                           IT.MGSIWCSV
C                           IT.LGSIWCSVLS..GS...IV.AIS
E                           .H.LMAAL...SATI...VF..R...ILQLFGKKVDDGSELSSASKTEVSSV.S.S.*
Homo sapiens Grün (MW)    .H.LMAAL...SATI...VF..R...ILQLFGKKVDDGSELSSASKTEVSSV.S.S.*
Homo sapiens Rot (LW)     .H.LMAAL...SATI...VF..R...ILQLFGKKVDDGSELSSASKTEVSSV.S.S.*
Bombus impatiens LWRh1    IS.LYTIWGSV...AN...IV.GISHPKY.LALKEKCP.CVFGKV..GK..SDAQSQATASEAESKA*
Drosophila melanogaster Rh1 .LT.LNTIWG.C...SA.C...IV.GISHPKY.IVLKEKCPMCFVGNP.EPKPDAPASDTETTSEADSKA*
Drosophila melanogaster Rh2 .LT.LNTIWG.T...IV.GISHPKY.IVLKEKCPMCFVGNP.EPKPDAPASDTETTSEADSKA*
Drosophila melanogaster Rh3 .LT.GATM...CAC.MV.CID.FV.AISHPRY.MELQKRCPWLNKAP.S.AVA.TST.QEQQQTAA*
Drosophila melanogaster Rh4 .LT.GATM...CTC.LV.CID.FV.AISHPRY.MELQKRCPWLNKAP.S.AVA.TST.QEQQQTAA*
Drosophila melanogaster Rh5 .IT.FVSM.LCLAC.SVSCLD.WV.ATSHPKY.LELERR.PWLGIREKHATSG.SGGQESVAS.SGDTLALSQN*
Drosophila melanogaster Rh6 .LS.LSTICGSV...AN..C..IV.GLSHPKYQVLEKMP.LAC-GK..LT.DSRTQATAEISESQA*

```

Abb.1: Alignment auf Aminosäureebene zur Überprüfung in der Literatur genannter Spectral Tuning Positionen bezüglich der 3 Käfer-Sequenzen. Übereinstimmungen mit der als Vergleichssequenz herangezogenen Sequenz vom Rhodopsin von *Bos taurus* (Bovine Rhodopsin) mit den jeweils anderen Sequenzen sind als Punkte dargestellt, bei Unterschieden zur obersten Sequenz ist die jeweilige an der betreffenden Position auftretende Aminosäure angeführt. Die Abkürzungen A, C und E bezeichnen die untersuchten Individuen *Pygo A*, *Pygo C* respektive *Eulasia E*. Bisher bekannte Spectral Tuning Positionen der angeführten Taxa sind folgenden Quellen entnommen: *Papilio glaucus* Rh1/*Papilio glaucus* Rh3/*Heliconius sara*: Briscoe (2001), *Bombus impatiens*: Spaethe & Briscoe (2004), *Drosophila melanogaster* Rh1-Rh6: Salcedo et al. (2009), *Homo sapiens* Grün/Rot: Neitz et al. (1991).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
A  ~~~~~GGTCATCTGGAGTTTATATTTTAAATTTACCTGGCTTTGGAAATAATTTCCCATATTATTAGCCAAGAAAG
B  ~~~~~A~~~~~
C  TGATTTTTT.....C.....
D  ~~~~~
E  ~~~~~C.CT.....C.....A.....G.....T.....
F  ~~~~~TTTTTT.....CT.....C.....A.....T.....

      90      100     110     120     130     140     150     160
A  TAATAAAAAAGAAGCATTGGTACACTAGGAATAATCTATGCTATAATAGCTATTGGATTACTAGGATTATTGTTTGGAG
B  ~~~~~T.....
C  ~~~~~T.....C.....
D  ~~~~~T.....
E  A.....G.....CG.TT.....T.C.....A.....T.....T.....
F  A.....G.....G.TT.....T.C.....A.....T.....T.....

      170     180     190     200     210     220     230     240
A  CTCATCATATATTTACAGTCGGAATAGATGTTGATACCTCGAGCATATTTTACCTCAGCTACTATAATTATTGCAGTACCA
B  ~~~~~
C  ~~~~~
D  ~~~~~
E  ~~~~~C.....C.T.A.....G.C.....A.....T.....T.....C
F  ~~~~~C.....C.T.A.....A.....G.C.....A.....T.....T.....T

      250     260     270     280     290     300     310     320
A  ACAGGAATTAAGATTTTATGTTGATTAGCAACCCCTTCAATGGTGTCCAATTAACCTTATTCACCCCTCTACTCTTTGAGCACT
B  ~~~~~T.....
C  ~~~~~T.....
D  ~~~~~T.....
E  ~~~~~A.....A.....C.C.....AT.C.....A.CT.....C.....C.....A.....AT.A.....T.CT.
F  ~~~~~G.....A.....A.....C.C.....AT.....A.CT.....C.....C.....T.....A.....AT.A.....T.CT.

      330     340     350     360     370     380     390     400
A  AGGGTTTGTATTCCTATTTACTGTAGGAGGTTTAAACAGGTGTAATCTTAGCAAATTCCTCAATTGATATTGTTTTACATG
B  T.....C.....
C  T.....C.....
D  T.....C.....
E  T.....T.....C.A.....AC.....A.....T.....T.....C.A.T.....C.T.....
F  T.....T.....C.A.G.....AC.....A.....T.....T.....C.A.T.....C.T.....

      410     420     430     440     450     460     470     480
A  TACTTATTATGTTGTTGCTCATTTCCTATGTTTATCTATAGGAGCAGTATTTGCTATTATAGCAGGATTTGTACAC
B  ~~~~~
C  ~~~~~
D  ~~~~~
E  ~~~~~A.....T.....C.T.....
F  ~~~~~A.....T.....C.T.....

      490     500     510     520     530     540     550     560
A  TGATTTCCCATTTTACAGGAGTATCTTTAAATAACAAATTTCTTAAAAATCCAATTTACAGTAATATTCATTGGAGTAAA
B  ~~~~~T.....C.....T.....
C  ~~~~~T.....C.....T.....
D  ~~~~~T.....C.....T.....
E  ~~~~~TC.....T.A.A.....C.CA.....T.....T.....GT.A.C.....
F  ~~~~~TC.....T.....T.A.A.....C.CA.....T.....T.....GT.A.T.....

      570     580     590     600     610     620     630     640
A  TTAAACATTTTCCCCAACATTTTCTAGGACTAAGAGGTATACCTCGACGTTATTCTGATTATCCAGATAATTTCTTGA
B  ~~~~~C.....
C  ~~~~~C.....
D  ~~~~~C.....
E  A.....C.....T.....T.....T.....A.....T.....A.....C.....C.....ATT.A.....
F  CA.....C.....T.G.....T.....T.....A.....T.....A.....C.....CC.ATT.A.....

      650     660     670     680     690     700     710     720
A  CATGAAATATAGTTTCATCAATTGGATCACTAATTTCACTAATTAGAGTTTTCGTATTTTATTCACTATTTGAGAAGGA
B  ~~~~~T.....
C  ~~~~~T.....
D  ~~~~~T.....
E  ~~~~~G.A.C.....C.T.....T.T.T.....T.G.....A.....TA.T.....T.A.....
F  ~~~~~G.A.C.....C.T.....C.T.T.....T.G.....A.....TA.T.....T.A.....

```

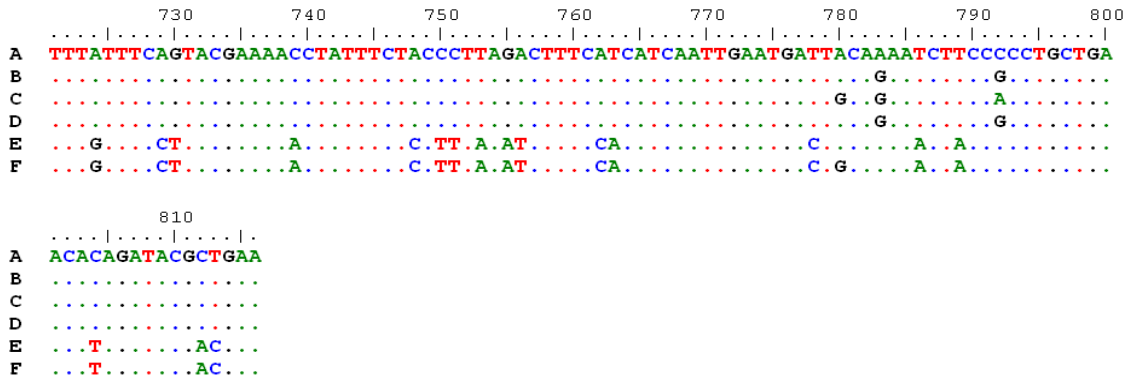


Abb.2: Alignment der CO1-Sequenzen auf Nukleotidebene. Übereinstimmungen mit der als Vergleichssequenz herangezogenen Sequenz von Individuum *Pygo A* mit den jeweils anderen Sequenzen sind als Punkte dargestellt, bei Unterschieden zur obersten Sequenz ist die jeweilige an der betreffenden Position auftretende Base angeführt. Die Abkürzungen A-D bezeichnen die Individuen *Pygo A-D*, während E-F für *Eulasia E-F* stehen.

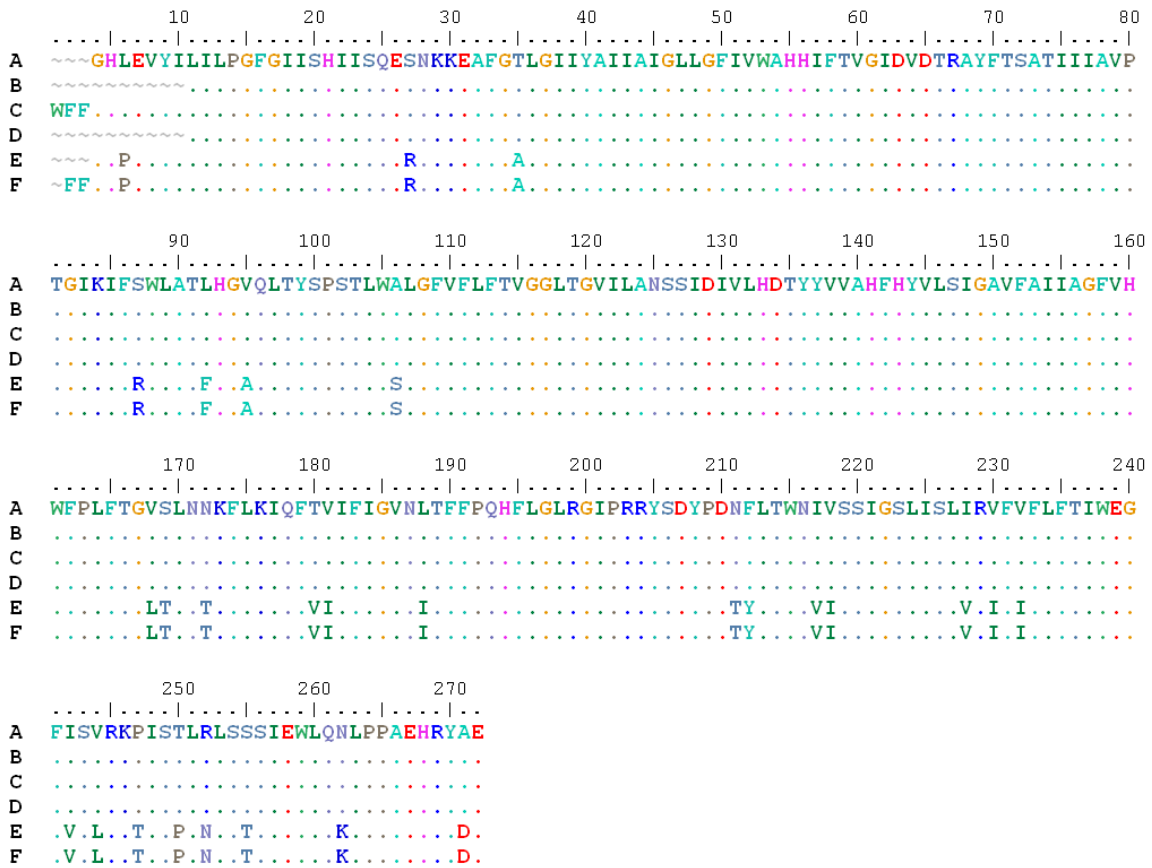


Abb.3: Alignment der CO1-Sequenzen auf Aminosäureebene. Übereinstimmungen mit der als Vergleichssequenz herangezogenen Sequenz von Individuum *Pygo A* mit den jeweils anderen Sequenzen sind als Punkte dargestellt, bei Unterschieden zur obersten Sequenz ist die jeweilige an der betreffenden Position auftretende Aminosäure angeführt. Die Abkürzungen A-D bezeichnen die Individuen *Pygo A-D*, während E-F für *Eulasia E-F* stehen.

Tab.4: Die insgesamt 27 Untersuchungsstandorte. In der Tab. aufgeführt sind alle Untersuchungsstandorte mit ihren Höhenlagen in Meter, ihren Hangausrichtungen (Standort 1-25), ihren Breitengraden (N: nördlich des Äquators) sowie Längengraden (EO: östlich vom Nullmeridian) in Grad (°), Winkelminuten (') und Winkelsekunden (").

Standort	Höhe	Hangausrichtung	N	EO
#1	891	S	40°00'37,7"	22°18'01,2"
#2	1034	SW	40°00'59,1"	22°17'59,3"
#3	1107	SW	40°01'14,9"	22°17'40,2"
#4	1170	SW	40°01'19,6"	22°17'39,6"
#5	1222	SW	40°01'12,0"	22°18'10,0"
#6	1346	SO	40°01'28,4"	22°18'22,8"
#7	642	NW	39°59'27,0"	22°18'02,9"
#8	797	SW	39°59'40,3"	22°18'27,8"
#9	811	N	39°59'40,4"	22°18'32,3"
#10	759	S	39°59'35,2"	22°18'17,9"
#11	954	SW	39°59'26,7"	22°19'25,4"
#12	974	SW	39°59'24,2"	22°19'28,1"
#13	1119	S	39°58'09,6"	22°20'17,9"
#14	669	W	40°03'33,4"	22°13'22,2"
#15	1014	W	40°02'23,1"	22°15'45,8"
#16	1172	NW	40°02'21,9"	22°16'27,8"
#17	1192	NW	40°02'22,0"	22°16'35,0"
#18	1257	W	40°02'08,0"	22°16'32,4"
#19	1336	SW	40°02'07,2"	22°16'49,8"
#20	508	W	39°59'53,2"	22°12'55,6"
#21	1470	SO	40°01'44,4"	22°18'31,8"
#22	1123	NO	39°58'20,7"	22°20'06,4"
#23	1026	SW	39°57'59,7"	22°20'49,4"
#24	1088	SO	39°58'14,2"	22°20'41,2"
#25	1148	SO	39°58'31,2"	22°20'41,4"
„Helene_1“-Stelle	307	/	39°48'46,6"	22°08'50,4"
„Mistkäfer“-Stelle	466	/	39°51'24,7"	22°15'05,5"

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Geboren am 13. Juni 1980
in Horn, 3580 (NÖ),
österreichische Staatsbürgerin,
ledig



Bildungsgang:

1986-1990 Volksschule Horn
1990-1993 Unterstufe Gymnasium
Horn
1993-1994 Hauptschule Horn
1994-1995 Sporthauptschule
Gars/Kamp, 3571 (NÖ)
1995-1999 Oberstufe Realgymnasium Horn
WS 1999-SS 2002 Studium der Japanologie und
Politikwissenschaft an der Universität Wien
WS 2003 Umstieg in Bakkalauretasstudium Japanologie →
Abschluss: März 2004
WS 2003-SS 2004 Studium der Internationalen
Betriebswirtschaft an der WU Wien
WS 2004-WS 2010 Studium der Biologie/Zoologie an der
Universität Wien
Seit WS 2010 Lehramtsstudium für die Unterrichtsfächer
Biologie & Umweltkunde sowie Geschichte,
Sozialkunde & Politische Bildung

Auslands- erfahrung:

WS 2002-SS 2003 Studienjahr an der Tōkyō Metropolitan
University (Japan)

Berufserfahrung:

SS 2002 Tutorin am Institut für Ostasienwissenschaften,
Japanologie, der Universität Wien
01. April 2005- Befristetes Vollzeit-Vertragsverhältnis als
30. Juni 2005 Universitätsassistentin in Ausbildung am
Institut für Ostasienwissenschaften,
Japanologie
August 2005 Mitarbeit an der EAJS-Konferenz (European
Association for Japanese Studies) in Wien
Seit WS 2005 Unbefristetes Vertragsverhältnis Fachbibliothek
für Ostasienwissenschaften, Bibliotheks- und
Archivwesen, Universität Wien (10
Stunden/Woche)
August 2007 Ferialpraktikum am Landeskrankenhaus Horn