

Phylogeographische Untersuchungen am Kupferstecher, *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera, Curculionidae)

Masterarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades
Dipl.-Ing.

ausgeführt am Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz,
Department für Wald- und Bodenwissenschaften

eingereicht an der Universität für Bodenkultur Wien

von

Wolfgang Josef Hintsteiner Bakk. techn.

Betreuer: Christian Stauffer, Ao. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr.

Co-Betreuerin: Coralie Bertheau, Dr. M.Sc.



Wien, November 2010

Kurzfassung

Der Kupferstecher, *Pityogenes chalcographus*, ist ein phytophager Borkenkäfer (Scolytinae) der vor allem von der Fichte, *Picea abies*, abhängig ist. An dieser kann er verheerende Schäden anrichten und ist deshalb, europaweit ein gefürchteter, forstlicher Schädling. Mitte der 1970er Jahre entdeckte man bei *P. chalcographus* eine unidirektionale Inkompatibilität: Die Kreuzung von zentraleuropäischen Weibchen mit nordeuropäischen Männchen ergab eine reduzierte Nachkommenschaft. Weiters fand man auch morphologische Unterschiede.

Phylogeographische Untersuchungen mit Hilfe eines mitochondrialen Markers, bestätigten diese Differenzierung, zeigten aber noch ein komplexeres Bild. So wurden insgesamt 58 Haplotypen entdeckt, welche in 6 Kladen untergliedert waren. Haplotypen eines Klades waren am stärksten im dinarischen Raum vertreten, wo auch *P. abies* ein eiszeitliches Refugium hatte. Die Haplotypen von *P. chalcographus* kamen auch südlich und nördlich der westlichen österreichischen und der Schweizer Alpen vor, bis in den Norden Deutschlands und dem Süden Griechenlands. In Richtung Zentraleuropa konnte allerdings kein Genfluss festgestellt werden. Da nur wenige Individuen analysiert wurden, sind in dieser Diplomarbeit 66 Individuen aus Kroatien und 47 Individuen aus dem westlichen Teil Zentraleuropas, Dole in Frankreich, anhand von mitochondrialen Sequenzdaten, untersucht worden, um die Haplotypenzusammensetzung dieser Regionen genauer zu erforschen.

Ein weiteres Refugium der Fichte war Kostroma, ein Gebiet in der südlichen russischen Ebene nördlich von Moskau. Von dort aus hat *P. chalcographus* vermutlich den Norden Europas besiedelt. Über die Kolonialisierung Russlands durch den Kupferstecher war bis dato noch nichts bekannt. Da *P. abies* in der Varietät *obovata* auch östlich des Urals vorkommt wurden zwei sibirische Populationen mit insgesamt 95 Individuen untersucht, um anhand von mitochondrialen Sequenzdaten, auch Aufschluss über die Besiedelung Russlands zu erhalten.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 58 neue Haplotypen entdeckt. Damit ist *P. chalcographus* mit insgesamt 106 Haplotypen einer der genetisch diversesten Borkenkäferarten. Die Analyse zeigte weiters eine ähnliche Verteilung der Kladen im dinarischen Raum, wie sie bereits in der früheren Untersuchung aufgezeigt wurde. Eine hohe berechnete Diversität der dortigen Populationen, lässt darauf schliessen, dass der Kupferstecher parallel zu *P. abies* in den Dinarischen Alpen ein eiszeitliches Refugium hatte. Die Analysen der russischen Populationen zeigten, dass dieses Gebiet durch europäische Haplotypen bzw. dem Refugialgebiet nördlich von Moskau stark beeinflusst ist.

Abstract

Pitogenes chalcographus is a phytophagous bark beetle belonging to the subfamily Scolytinae which is strongly dependent on Norway spruce, *Picea abies*. There it causes damages and is an important forest pest. In the middle of the 70s a unidirectional incompatibility was detected between females from Central Europe and males from Northern Europe. Also morphological differences could be found between these two groups.

Phylogeographic analysis revealed a more complex picture. 58 haplotypes were detected which corresponded to six clades. One clade was dominant in North Europe and another one in South Europe. The four other clades opened new questions. One clade was dominant in the Dinaric region, where spruce had a refugial area during the last ice ages. The haplotypes of this clade were also detected in the North and South of the Western Austrian and Swiss Alps, but also in the North of Germany and the South of Greece. No gene flow could be detected from Croatia to Central Europe. In this thesis 66 individuals from Croatia and 47 from France were analysed with mitochondrial sequence data to obtain more information.

Another refugia of spruce was in the Southern Russian Plain near Moscow. From there it is hypothesised that *P. chalcographus* colonized North of Europe. About the colonization of Russia nothing is known. For this reason two Russian populations were elaborated by genetic means to compare those with the gene bank data of *P. chalcographus*.

58 new haplotypes could be detected. With 106 haplotypes in total *P. chalcographus* presents the most variable bark beetle in Europe. The high diversity of the Dinaric populations enforce the model that *P. chalcographus* parallel to spruce had the same refugium in this region. The analysis of the Russian populations showed that this region was mainly influenced from Europe and the area north of Moscow.

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Christian Stauffer für die hervorragende Betreuung bedanken. Er hat sich für meine vielen Fragen immer Zeit genommen und ein offenes Ohr für meine Anliegen gehabt. Ich habe noch keinen vorbildlicheren Hochschullehrer getroffen, der durch seine kollegiale Art einem stets das angenehme Gefühl vermittelt willkommen zu sein. Herr Prof. Christian Stauffer wird für mich stets Vorbild und Mentor sein.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Coralie Bertheau. Sie hat mir stets geholfen und mich bei meiner Masterarbeit hervorragend unterstützt.

Herrn DI Hannes Schuler und Frau Susanne Krumböck möchte ich ebenfalls für die stets freundliche Unterstützung meiner Arbeit danken.

Dem gesamten Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz gilt mein Dank dafür, dass ich mich dort niemals fremd gefühlt habe.

Meiner Partnerin Frau DI Marion Keßler möchte ich für die große Geduld und für ihren beratenden Beistand danken. Sie war und ist für mich eine Quelle der Ruhe und der Inspiration.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern Alfred und Manuela Hintsteiner danken. Ohne sie wäre ich niemals Forstmann geworden. Sie haben mich in meinem Streben zu studieren stets unterstützt und waren immer ein Rückhalt für mich.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	i
Abstract	ii
Danksagung.....	iii
Inhaltsverzeichnis	iv
1 Einleitung	1
1.1 Die letzte Eiszeit in Europa	1
1.1.1 Wiederbesiedelung Europas.....	1
1.2 Die Fichte und ihre Verbreitung.....	4
1.2.1 Die Fichte während und nach der letzten Eiszeit.....	5
1.2.2 Genetische Struktur.....	6
1.3 Die mitochondriale DNA in der Phylogeographie.....	7
1.3.1 Vor- und Nachteile der Verwendung der mtDNA als Marker.....	8
1.4 Der Kupferstecher, <i>Pityogenes chalcographus</i>	9
1.4.1 Gibt es eine Rassendifferenzierung von <i>P. chalcographus</i> in Europa?	9
1.4.2 Phylogeographie von <i>P. chalcographus</i>	10
1.5 Ziele meiner Masterarbeit	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Probennahme von <i>Pityogenes chalcographus</i>	13
2.2 Genetische Arbeiten	13
2.2.1 Extraktion.....	13
2.2.2 Amplifikation der mtDNA mittels PCR	13
2.2.3 PCR-Aufreinigung	14
2.3 Datenanalyse	14
3 Ergebnisse und Diskussion	16
3.1 In silicio Analysen der COI-Sequenz	16
3.2 Phylogenetische Rekonstruktion	18
3.3 Verteilung der Haplotypen in Europa	20
3.4 Diversitätsverteilung	22
Literaturverzeichnis	25
4 Anhang	30
4.1 Haplotypen und deren Anteil über die fünf Populationen mit den zugehörigen Individuen.....	30

4.2	Verteilung der Haplotypen der Population KJa.	34
4.3	Verteilung der Haplotypen der Population KSa.....	35
4.4	Verteilung der Haplotypen der Population RuSv.....	37
4.5	Verteilung der Haplotypen der Population RuLu.	39
4.6	Verteilung der Haplotypen der Population FrDo.	41
4.7	Allgemeine Angaben zu den Populationen	43
4.8	Unverwurzelter Neighbor-Joining-NJ Baum aller 106 Haplotypen.	44
4.9	TCS-Netzwerk, eine Linie repräsentiert eine Mutation.	45

1 Einleitung

1.1 Die letzte Eiszeit in Europa

Mit der Bildung der arktischen Eiskappe vor ungefähr 2,4 Millionen Jahren, begann auch das erdgeschichtliche Zeitalter des Quartärs, welches als das känozoische Eiszeitalter bekannt ist. Von dieser Zeit an bis vor ca. 900 000 Jahren betrug die Zyklen von einer Warmzeit zur nächsten 41 000 Jahre. Danach setzte ein Zyklus von 100 000 Jahren ein. Als Ursache dafür wird die Croll-Milankovitch-Theorie genannt. Diese besagt, dass die Exzentrizität des Erdborbits als treibende Kraft für die Zyklen der Eiszeiten dient (Bennet 1997, Williams et al. 1998).

Die Zeit seit dem letzten Interglazial „Eem“ (135 000 bis 115 000 Jahren) und dem jetzigen, „Holozän“ genannt, ist am besten erforscht. Es änderte sich im „Eem“ die Temperatur um 10 bis 12°C, innerhalb von nur 5 bis 10 Jahren, für Perioden von 70 bis 5000 Jahren. Das ist ein großer Unterschied zur jetzigen Warmzeit, welche als relativ stabil angesehen werden kann (Tzedakis et al. 1994). Solche drastischen Temperaturschwankungen in der erdgeschichtlichen Vergangenheit hatten großen Einfluss auf die damalige Fauna und Flora (Hewitt 1999, Hewitt 1996).

Während des letzten Glazials reichte die Eiskappe in Europa bis zum 52ten nördlichen Breitengrad etwa bis Mitteldeutschland. Auch waren die größeren Gebirgszüge wie die Alpen, der Kaukasus oder die Pyrenäen mit weitläufigen Gletschern bedeckt. Zwischen den Eisschildern beherrschten Tundra, Permafrostböden und Steppen das Landschaftsbild (Abb. 1.1) (Hewitt 1999).

1.1.1 Wiederbesiedelung Europas

Auf dem letzten Höhepunkt der Eiszeit vor rund 18 000 Jahren lebten die meisten Arten in Refugien auf der iberischen Halbinsel, in Italien und dem Balkan. Vor ca. 16 000 Jahren begann sich das Klima zu erwärmen und es kam zu einer Ausbreitung der Arten. Jedoch setzte vor ca. 11 000 Jahren erneut eine Abkühlung für eine Dauer von ungefähr 1000 Jahren ein, was verheerende Auswirkungen auf viele Arten hatte. Vor 6000 Jahren stellte sich großteils die heute bekannte Verbreitung der Fauna in Europa ein (Hewitt 1999).

Kiefernarten konnten bei der Wiederbesiedelung eine Reichweite von bis zu 1500 Metern im Jahr aufweisen (Bennet 1986). Die phytophage Tierwelt folgte dabei meist rasch (Coope 1990). Dies war bei Kräutern und Gräsern ausgeprägter als bei Bäumen (Hewitt 1999).

Die Topografie spielte bei der Wiederbesiedelung eine wesentliche Rolle. Im Süden war eine Barriere durch das Mittelmeer, die Sahara, das Schwarze Meer und den Gebirgszügen in der östlichen Türkei

gegeben (Abb. 1.2). Im Osten Europas war der Ural eine geographische Barriere, im Westen war der atlantische Ozean unbezwingbar (Hewitt 1999, Hewitt 1996).

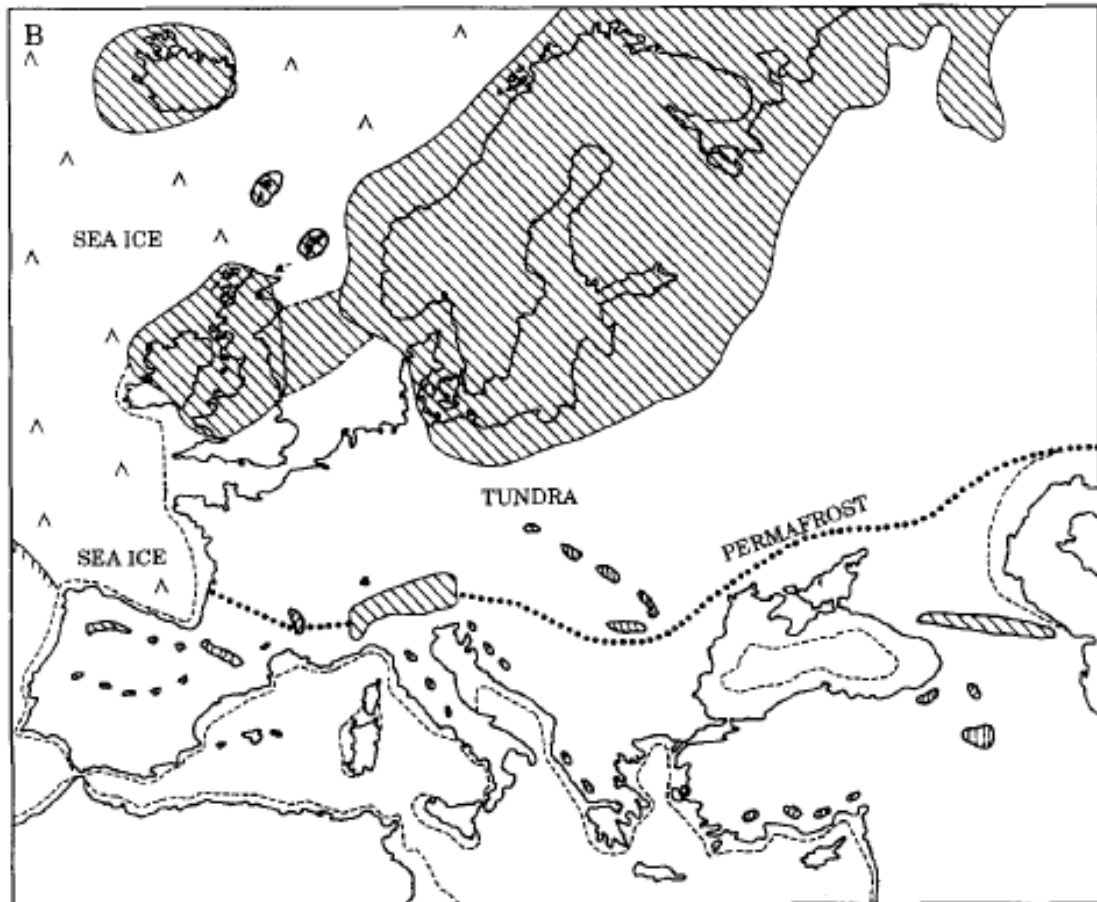


Abbildung 1.1 Europa vor ca. 18 000 Jahren mit Eisbedeckung und Permafrost weit in den Süden (Hewitt 1999).

Der Süden Europas war ein wichtiges Refugialgebiet für viele Arten. Durch seine topografische und klimatische Diversität, wies er eine Vielzahl an unterschiedlichen Habitaten auf (Hewitt 1999). Nach der Erwärmung kam es zu einer Ausbreitung vom Rande dieser Refugien in Richtung Norden. Die Arten, welche sich über weite Strecken verbreiten konnten, etablierten neue Populationen weitab ihres ursprünglichen Herkunftsgebietes. Da sich manche Arten im Laufe der langen Zeiten in den unterschiedlichen Refugialgebieten zu stark genetisch differenziert hatten, kam es zu Hybridisierungsgebieten, in denen Inkompatibilitäten festgestellt werden können (Virdee & Hewitt 1994, Hewitt 1996). Dies und klimatische Oszillationen führten zu verstärkter genetischer Drift und zu Selektionsprozessen, die in starken Abweichungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts resultierten (Hewitt 1996).

Wiederholte Populationsgründungen in besiedelbar gewordenen Gebieten verstärken diesen Effekt (Hewitt 1999).

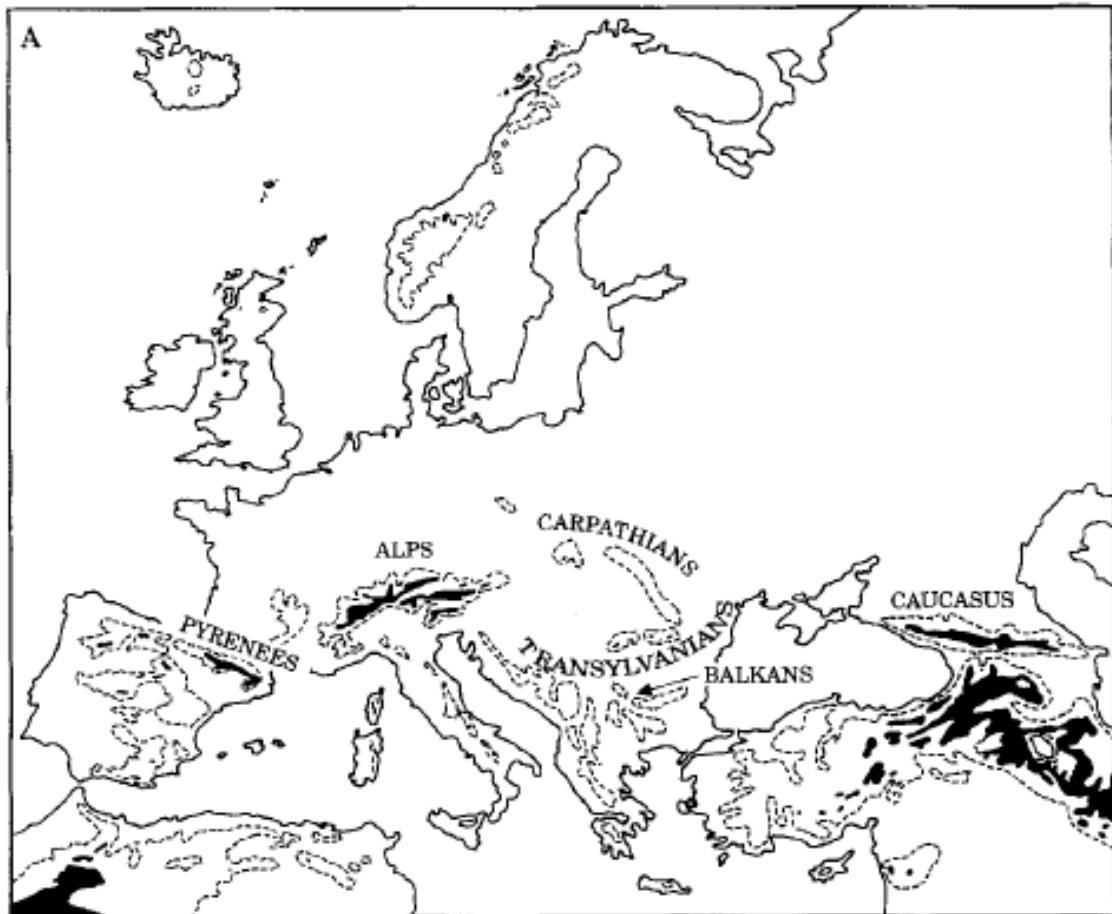


Abbildung 1.2 Gebirgszüge in Europa (schwarz über 2000m, strichliert über 1000m). Diese stellen bei der Wiederbesiedelung geographische Barrieren dar (Hewitt 1999).

Bei einer Ausbreitung kann man zwischen einer Pionier- und einer Phalanxstrategie unterscheiden. Bei der ersteren kommt es zu einer raschen Verbreitung, die aber mit zunehmender Entfernung mit einer Anreicherung der Homozygoten einhergeht. Bei der Phalanxstrategie hingegen kommt es nur zu einer langsamen und gleichmäßigeren Verteilung der Allele (Hewitt 1996).

Durch die geographisch getrennte Entwicklung in den eiszeitlichen Refugialgebieten existieren in Europa Unterarten die heute geographisch getrennt (allopatrisch) oder geographisch überlappend (sympatrisch) vorkommen (Willis & Whittaker 2000, Dapporto 2010, Mehner et al. 2010). Zwischen den allopatrischen Verbreitungsgebieten können Hybridzonen auftreten (Abb. 1.3), deren Individuen eine reduzierte Fitness aufweisen. Dies hat zur Folge, dass der Genfluss zwischen den beiden Populationen geringer ist, so diese Hybride auch als „Platzhalter“ zwischen den Populationen dienen und ihre genetische, getrennte Entwicklung garantieren können. Als Hybridzonen fungieren oft Gebiete um geographische Barrieren wie Gebirge (Barton & Hewitt 1989).

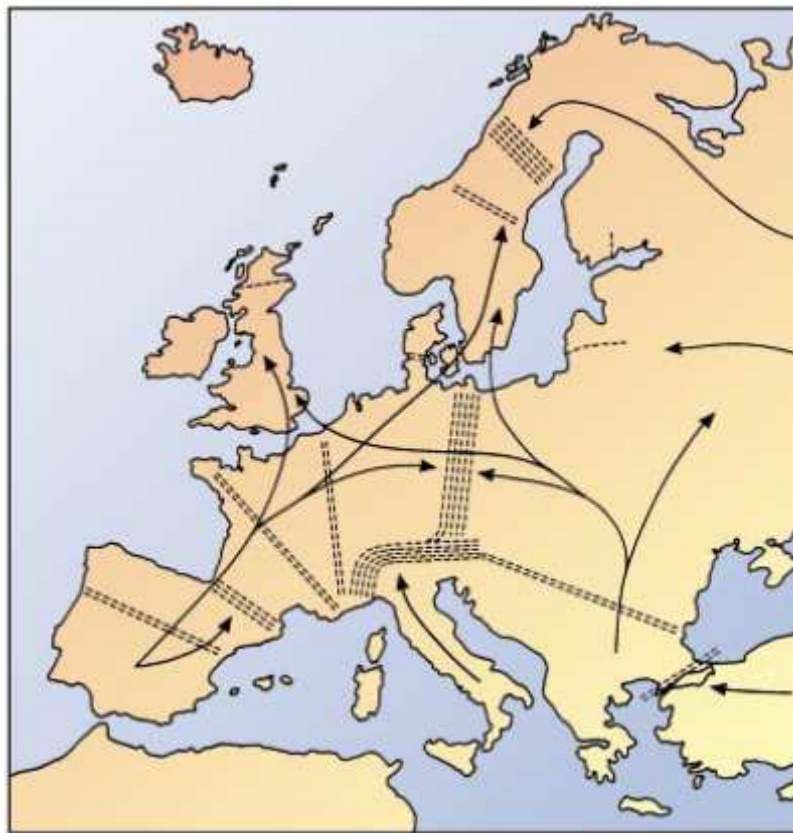


Abbildung 1.3 Allgemeine Position bekannter Hybridzonen in Europa. Diese haben ihre Begründung in der Kommunalität der Eiszeitrefugien, dem Grad an postglazialer Expansion (Pfeile) und physischen Barrieren (Hewitt 2000).

1.1.2 Die Fichte und ihre Verbreitung

Die Fichte (*Picea abies*) ist eine der weitverbreitetsten und forstlich wichtigsten Baumarten in Eurasien (Schmidt-Vogt 1991). Ihr Vorkommen reicht dabei im Westen vom Massif du Vercors, östlich von Rhône, bis zum Ochotskischen Meer im Osten. Östlich des Urals dominiert die sibirische Fichte

(*Picea abies* var. *obovata*), wobei entlang des Urals Hybridisierungen mit der europäischen Fichte (*Picea abies* var. *europaea*) auftreten. Ihre systematische Eingliederung ist jedoch kontrovers. Unterschieden wird *P. abies* var. *obovata* von *P. abies* var. *europaea* anhand der Zapfenschuppenform (Schmidt-Vogt 1977). Während es Autoren gibt, die für eine eigene Art von *P. obovata* plädieren (Ledebour 1833, Fedorovic 1876, Orlov 1955, Pravdin 1975), spricht Schmidt-Vogt (1977) von einer Variante, welche unter Kaltklimateinfluss entstand. Doch auch bereits andere Autoren vor ihm sprachen sich gegen eine Ausscheidung als eigene Art aus (Teplouchoff 1868, Berg 1887). Neuere genetische Untersuchungen scheinen dies zu bestätigen. So konnten Krutovskii & Bergmann (1995) keine größeren Unterschiede feststellen und sprechen lediglich von zwei unterschiedlichen Rassen.

1.1.3 Die Fichte während und nach der letzten Eiszeit

Die Fichte war im „Eem“ und in den frühen Interstadien des Weichsel-Glazials weit verbreitet. Die zunehmende Erkaltung zwang sie jedoch immer wieder in wärmere Refugien. Während des letzten Höhepunktes des Glazials überlebte *P. abies* getrennt im Norden und im Südosten Europas. Insgesamt kann man sieben Refugialgebiete unterscheiden (Tollefsrud et al. 2008): Böhmisches Masse, Südost-Alpen, nördl. Dinarischen Alpen, Nordkarpaten, Südkarpaten, südwestliche bulgarische Berge, südliche, russische Ebene. Mit der Erwärmung expandierte die Fichte von dort aus hauptsächlich in nördliche und westliche Richtung. Die Böhmisches Masse mit dem südlichen Vorland war ein Rückzugsgebiet, welches vermutlich von dem Gebiet in den Südost-Alpen, von wo aus die Fichte in westliche Richtung expandierte, beeinflusst wurde. Aus dieser Region drang die Fichte bis zum Harzgebirge vor. Von den Refugien der Dinarischen Alpen, der südlichen Karpaten und den Bergregionen im südwestlichen Bulgarien fand keine nördliche Expansion statt, da die trockenen Ebenen von Zentral- und Südosteuropa vermutlich eine ökologische Barriere bildeten. Der Norden Europas wurde von einem einzigen großen Refugium aus besiedelt, welches in der südlichen russischen Ebene, nahe Kostroma, beheimatet war. Die südliche und die nördliche Abstammung der Fichte, trafen sich erst in jüngerer Zeit während des Holozäns in Mitteleuropa (Abbildung 1.4) (Schmidt-Vogt 1977, Latalowa & van der Knaap 2006, Tollefsrud et al. 2008). Den Fichtenpopulationen in Sibirien blieb eine geographische Trennung in verschiedene Refugialgebiete während der letzten Eiszeit erspart. Die Wälder konnten dort je nach Klima in die verschiedenen Himmelsrichtungen ausweichen (Schmidt-Vogt 1977).

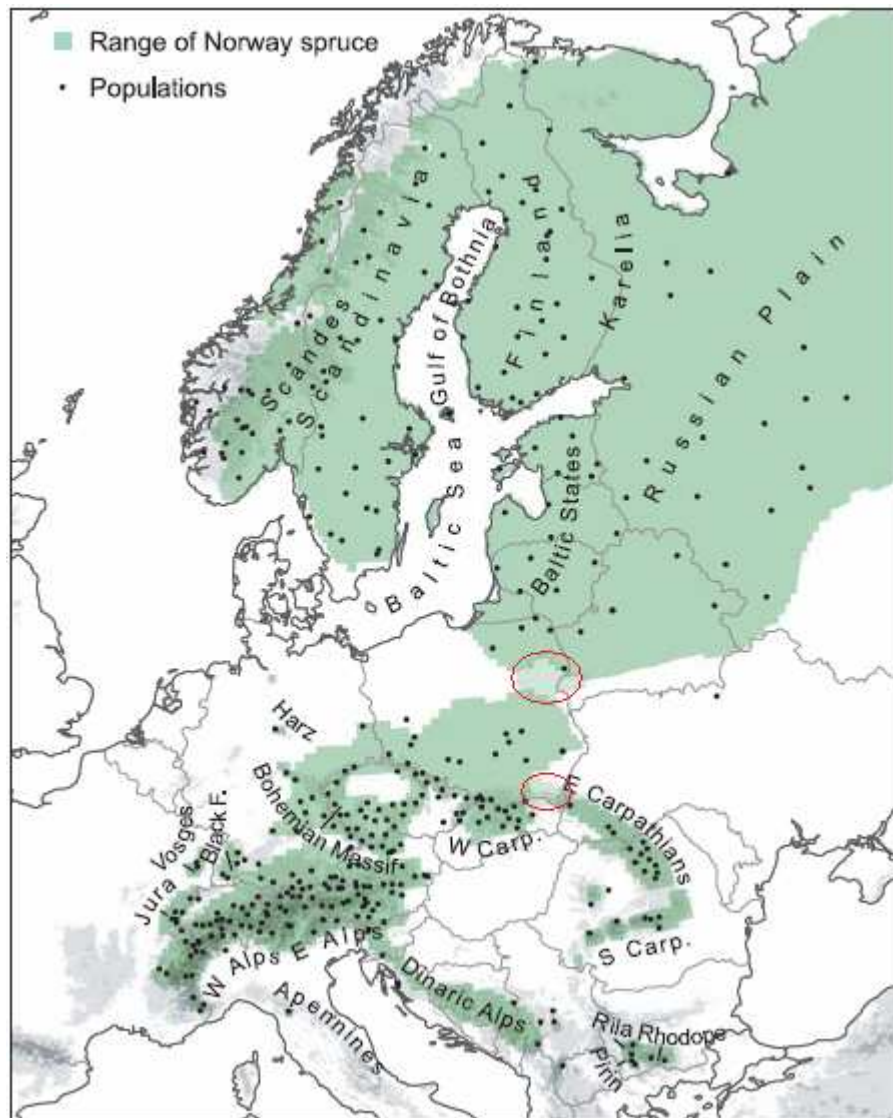


Abbildung 1.4 Natürliche Verbreitung der Fichte gekennzeichnet durch die grüne Fläche; Kontakt von Fichtenpopulationen unterschiedlicher Herkunft ist durch rote Umrandung markiert (Tollefsrud et al. 2008).

1.1.4 Genetische Struktur

Die Fichtenpopulationen des Nordens unterscheiden sich von jenen des Südens in ihrer genetischen Struktur (Tollefsrud et al. 2008). In manchen Regionen, wie in Teilen der Westkarpaten und Südwestbulgariens, ist die genetische Diversität gering. Auch musste die Fichte genetische Diversität bei der Wiederbesiedelung der Alpen, von Ost nach West, einbüßen. Die nördlichen Teile der Alpen bis hin zum Schwarzwald waren davon jedoch weniger betroffen. Die hohe Diversität im Süden Europas ist auf eine Durchmischung der Kolonialisierungstrecken aus den Refugien zurückzuführen (Lagercrantz & Ryman 1990, Tollefsrud et al. 2008). Da auch der Norden eine hohe genetische Diversität und eine

geringe Differenzierung aufweist, bestätigt dies ein großes Refugialgebiet mit hoher Populationsdichte. Lediglich die nördlichsten Populationen weisen Defizite aufgrund von genetischer Drift und ungünstigen klimatischen Bedingungen auf. Skandinavien wurde vom russischen Refugium aus, über zwei Migrationsrouten wiederbesiedelt. Eine über Land in nordwestlicher Richtung und eine über Wasser in südwestlicher Richtung. Der Baltische Meerbusen war damals gefroren und da die Fichte ihren Samen im Winter verbreitet, kann angenommen werden, dass dieser hunderte Kilometer über Eis durch Wind verbreitet wurde. Dies trug zur Aufrechterhaltung der genetischen Diversität bei (Tollefsrud et al. 2009, Tollefsrud et al. 2008). Es sei festgehalten, dass *P. abies* sich nach wie vor in einem Prozess der genetischen Adaption und Differenzierung befindet, da morphologische Unterschiede, mit ein paar Ausnahmen, nicht auf lokale Anpassungen zurück zu führen sind. Dies ist eine wichtige Überlegung für etwaige Züchtungsprogramme (Lagercrantz & Ryman 1990).

1.2 Die mitochondriale DNA in der Phylogeographie

Phylogeographie ist das erste Mal von Avise et al. (1987) geprägt worden. Sie versucht genetische Daten von Organismen im Kontext zu ihrer geographischen Verteilung zu sehen. Die Phylogeographie berücksichtigt aber auch unter anderem, klimatische und geologische Fragestellungen (Hickerson et al. 2010)

Das Sequenzieren von mitochondrialen Regionen ist in der Phylogeographie von In- und Vertebraten die meist verwendete Technik (Behura 2006). Eine Erklärung über die Entstehung von diesen Zellorganellen liefert die Endosymbiontentheorie (Campbell & Reece 2006). Diese besagt, dass unter anderem Mitochondrien früher frei lebende, zur aeroben Atmung befähigte Bakterien waren. Diese Urbakterien mit eigener DNA, wurden von eukaryotischen Zellen aufgenommen, woraus sich eine Symbiose entwickelte. Die heutigen Zellorganellen haben ungefähr nur mehr ein Zehntel der Gene, der kleinsten bekannten Bakterien (Klug et al. 2007).

Die mitochondriale DNA (mtDNA) ist fast ausschließlich plasmidförmig und beinhaltet mehrere Kopien pro Zelle. Die Länge der tierischen mtDNA reicht dabei von ca. 14 kpb bis 42 kbp. Die mtDNA der Insekten beinhaltet dabei 2 rRNA, 22 tRNAs und meist 13 proteincodierende Gene, wobei Introns zumeist fehlen (Clary & Wolstenholme 1985, Crozier & Crozier 1993). Auch findet man im Gegensatz zur nuklearen DNA nur wenig nichtcodierende DNA (Klug et al. 2007). Zu den zuvor genannten 13 Genen (Abb. 1.5) gehört auch das Cytochrom Oxidase I (COI), welches an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt ist (Beebee & Rowe 2008). Diese ist in der molekularen Ökologie der Insekten die meistverwendete Genregion (Simon et al. 1994, Lunt et al. 1996).

schen Analyse führt (Beebe & Rowe 2008, Behura 2006). Ein weiterer Vorteil der mtDNA ist, dass es kaum zu Rekombinationsereignissen kommt, was die Interpretation unkompliziert macht (Lunt et al. 1996).

Ein Nachteil der mtDNA ist, dass bestimmte endosymbiontische Bakterien, wie *Wolbachia*, zu Fehlinterpretationen führen können (Werren et al. 2008). Diese sind bei sehr vielen Insekten nachgewiesen worden und können nur maternal, was auch die Assoziation mit den Mitochondrien bestätigt, vererbt werden (Hilgenboecker et al. 2008). Um dies zu fördern wenden sie verschiedene Strategien, wie die unidirektionale Inkompatibilität, an. Hier kommt es bei Paarung von infizierten Männchen mit uninfizierten Weibchen zum Tod der befruchteten Eier (Werren et al. 2008).

1.3 Der Kupferstecher, *Pityogenes chalcographus*

Die Borkenkäfer (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) spielen in der europäischen Forstwirtschaft als Schaderreger eine bedeutende Rolle. Der Kupferstecher, *Pityogenes chalcographus* (Linné 1761), prominenter Vertreter dieser Unterfamilie, ist in ganz Europa, gebunden an seine Hauptwirtsbaumart Fichte, weit verbreitet (Schwenke 1974, Pfeffer 1994, Bertheau et al. 2009). Deshalb wird auch hinsichtlich seiner Phylogeographie eine enge Beziehung mit jener der Fichte angenommen (Avtzis et al. 2008). *P. chalcographus* brütet bevorzugt im dünnrindigen Bereich und ist zusammen mit dem Buchdrucker (*Ips typographus*) einer der wirtschaftlich und forstlich bedeutendsten Schaderreger in vielen Gebieten Europas (Schwenke 1974, Schwerdtfeger 1957, Weigerstorfer 2003, Altenkirch et al. 2002). Seine Gefährlichkeit ist eine Folge aus der Generationsanzahl, seine effizientes Aggregationsverhalten mittels Pheromonen (Byers 2004), seiner Assoziation mit Bläuepilzen (Kirisits, 2004) und einigen anderen Faktoren (Lieutier et al. 2004).

1.3.1 Gibt es eine Rassendifferenzierung von *P. chalcographus* in Europa?

Führer (1976) konnte bei europäischen Kupferstecherpopulationen unidirektionale Inkompatibilität anhand von Kreuzungsversuchen feststellen. Diese tritt hauptsächlich bei Kreuzungen von Weibchen aus Zentraleuropa mit Männchen aus Nordeuropa auf. Doch auch zwischen benachbarten Populationen konnte eine solche einseitige Inkompatibilität festgestellt werden (Führer 1976). Unterstützt durch morphologische Untersuchungen, unterteilte Führer (1978) diese beiden Populationen in 2 Gruppen bzw. Rassen (Abb. 1.6).



Abbildung 1.6 Verbreitung der nördlichen und zentraleuropäischen Kupferstecherpopulationen nach Führer (1978) und deren Kontaktzone - strichlierte Linie (Avtzis et al. 2008).

1.3.2 Phylogeographie von *P. chalcographus*

Mitochondriale DNA-Untersuchungen des mitochondrialen COI-Gens von 695 Individuen aus verschiedenen europäischen Kupferstecherpopulationen zeigten ein noch komplexeres Bild. Sie wiesen *P. chalcographus* aufgrund der hohen Diversität zwischen den Populationen und nur einer geringen innerhalb der Populationen, als hoch strukturierte Art aus. Die Analysen ergaben eine Untergliederung in 3 Hauptkladen, welche insgesamt 58 verschiedene HT beinhalten (Abb. 1.6). Klade III wurde in weitere 4 kleinere Kladen unterteilt (Avtzis et al. 2008).

Die meist sympatrisch auftretenden Haplotypen der Kladen I und IIIa wiesen insgesamt um die 80 % der untersuchten Individuen auf (Avtzis et al. 2008). Diese beiden Hauptkladen haben sich vor ungefähr 700 000 bis 1 000 000 Jahren auseinander entwickelt (Avtzis et al. 2008). Die HT der Klade I sind im Nordosten am häufigsten und nehmen in Richtung Zentraleuropa ab. Umgekehrt verhält es sich mit den HT der Klade IIIa, welche in Zentraleuropa dominieren (Avtzis 2006).

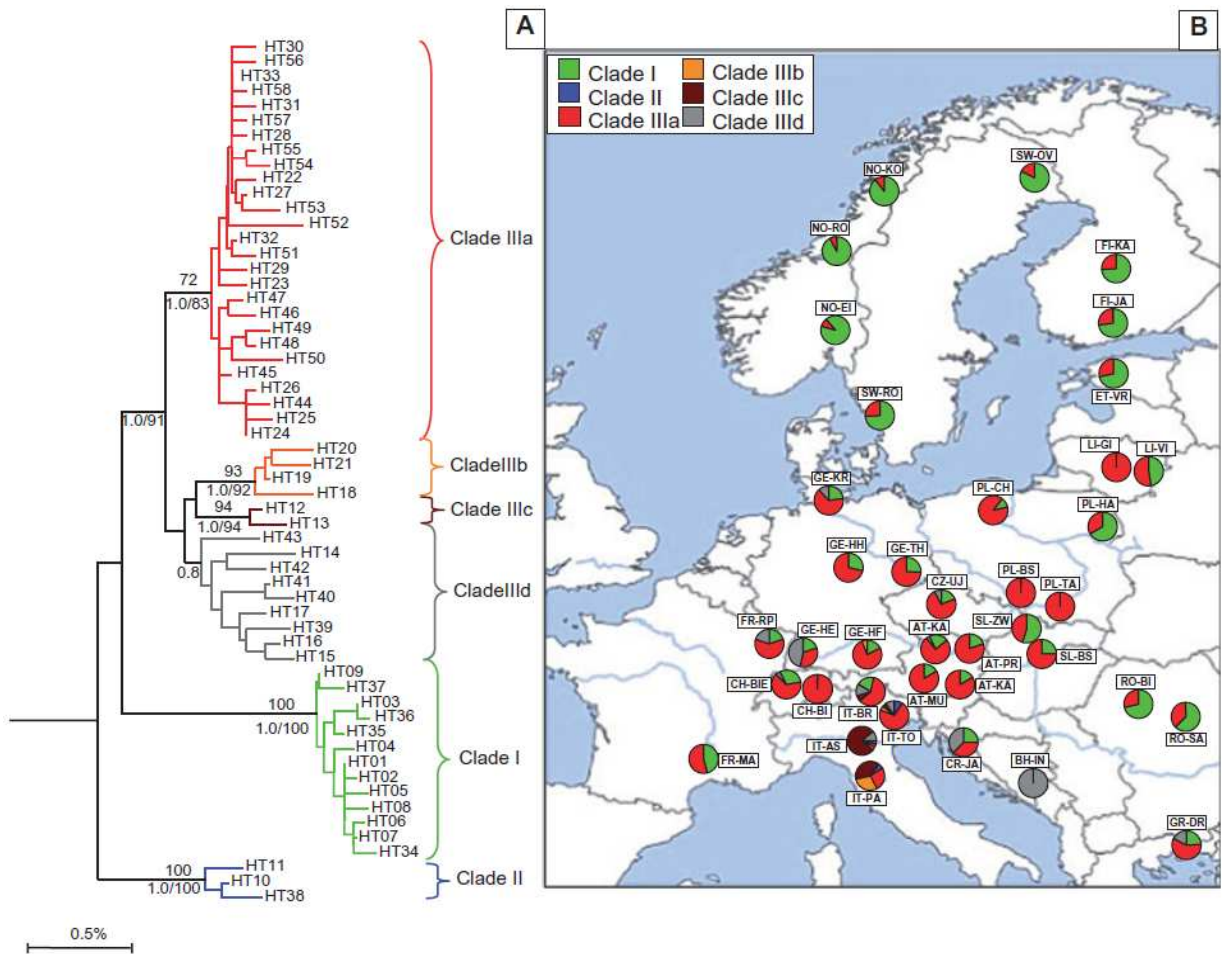


Abbildung 1.7 Kladen mit HT, deren Häufigkeit und Verbreitung von *P. chalcographus* (Avtzis et al. 2008).

Die höchste Differenzierung wurde zwischen den HT der beiden Hauptkladen gefunden. Dies lässt auf mindestens zwei geographische Gruppen (Nordost- und Zentraleuropa) schließen und bestätigt die Hypothese von Führer (1976, 1978). Es ist wahrscheinlich, dass klimatische Oszillationen im Quartär diese Differenzierung herbeigeführt haben. Vermutlich sind die beiden Hauptkladen bereits vor langer Zeit (ca. 1 Mio Jahre) in separaten, unbekanntenen, eiszeitlichen Refugien differenziert und lagen bei den letzten Eiszeiten bereits sympatrisch in den Refugien vor. Die bestehende unidirektionale Inkompatibilität hat eine allzu große Durchmischung des Genpools verhindert. Im Norden kann auch Selektionsdruck aufgrund der extremen Umwelteinflüsse, aber auch den Adaptationsprozessen des Kupferstechers an die unterschiedlichen Fichtenprovenienzen angenommen werden (Avtzis et al. 2008).

Avtzis et al. (2008) konnte jedoch noch andere Gruppen unterscheiden. So fand er die HT der Kladen II, IIIb und IIIc nur in den italienischen Populationen, weshalb im Apennin ihr Ursprung ähnlich der Fichte vermutet werden kann. Haplotypen der Klade IIId hingegen hatten im Balkan ihren Ursprung und nahmen gegen Zentraleuropa hin ab (Avtzis 2006).

1.4 Ziele meiner Masterarbeit

Der Balkan und die dinarische Region waren wichtige Refugialgebiete des Kupferstechers. Es konnte nur wenig Genfluss vom Dinarischen Gebirge in Richtung Zentraleuropa gezeigt werden (Avtzis et al. 2008). Andererseits kommen Haplotypen (HT) der dinarischen Gruppe auch südlich und nördlich der westlichen österreichischen und Schweizer Alpen vor. In dieser Arbeit wurde daher noch eine französische Population untersucht um den Genfluss vom dinarischen Gebiet nach Zentraleuropa besser zu dokumentieren. Weiters wurden in dieser Arbeit mehr Individuen vom Dinarischen Gebirge mit Hilfe von mitochondrialen Sequenzdaten untersucht und mit jenen von Avtzis et al. (2008) verglichen.

Der Norden Europas und der Westen Russlands wurden durch *Picea abies* von einem einzigen, großen Refugialgebiet aus besiedelt, dem Gebiet Kostroma etwa 100km nördlich von Moskau (Schmidt-Vogt 1977, Lagercrantz & Ryman 1990, Tollefsrud et al. 2008, Tollefsrud et al. 2009). Die genetische Struktur von *P. chalcographus* in diesem Gebiet ist unbekannt. Deshalb wurden zwei russische Kupferstecherpopulationen genetisch analysiert und mit den europäischen HT verglichen. Diese Analyse soll zeigen, ob in diesem Gebiet europäische HT vorherrschen oder dieses Gebiet durch ein asiatisches Einzugsgebiet genetisch beeinflusst ist.

2 Material und Methoden

2.1 Probennahme von *Pityogenes chalcographus*

Es wurden 208 Adulttiere von *Pityogenes chalcographus* aus fünf verschiedenen Populationen gesammelt und untersucht. Diese waren Dole 2007 mit 47 Individuen (Frankreich, Code - FrDo), Sverdlovsk 2009 (Code - RuSv) mit 48 Individuen, Luchanovo 2009 (Code - RuLu) mit 47 Individuen (beide Russland), Soborsko 2009 (Code - KSa) mit 48 Individuen und Jastrebarsko 2004 (Code - KJa) mit 18 Individuen (beide Kroatien). Die gesammelten Tiere wurden für die DNA-Analyse in 96%igen Alkohol bei -20°C gelagert.

2.2 Genetische Arbeiten

2.2.1 Extraktion

Die DNA wurde unter Verwendung des GenElute™ Mammalian Genomic DNA Minirep Kit (Sigma, USA) extrahiert. Dabei wurde das vom Hersteller empfohlene Protokoll verwendet: Die einzelnen Individuen wurden in einem 1,5ml Eppendorf zusammen mit 180 µl „Lysis Solution T (B-6678)“ vermengt und danach homogenisiert. Anschließend wurden 20 µl „Sigma Proteinase K“ beigemischt, und mindestens 2 h lange bei 55°C und 450 rpm geschüttelt. Danach wurden 20 µl RNase und 200 µl von „Lysis Solution C (B-8803)“ beigefügt und neuerlich bei 70°C und 450 rpm für 10 min inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA mit 200 µl absoluter Alkohol präzipitiert, gut geschüttelt und auf eine Silika-Membran durch Zentrifugation (1 min, 8000 rpm) gebunden. Nach zweimaliger Reinigung mittels 500 µl Waschlösung wurde die DNA in 50 µl „Elution Solution“ aus der Silika-Membran herausgelöst. Die Lagerung erfolgte kurzfristig im Kühlschrank bei 4°C bzw. über längere Zeiträume bei -20°C im Gefrierschrank.

2.2.2 Amplifikation der mtDNA mittels PCR

Die Vervielfältigung mittels „Polymerase Chain Reaction PCR“ der gewünschten DNA-Sequenz erfolgte über 25 µl Reaktionen, in einem Primus 25 Thermocycler (PeqLab, Deutschland) in 0,2 ml Eppendorfs (Biozym, Deutschland). Dazu wurden 14,5 µl H₂O_{dd}, 2,5 µl 10 x PCR Buffer, 2 µl MgCl₂, 1 µl dNTPs (Mix zu je 2,5 mM), jeweils 1,25µl F-Primer PcCoIF 5'-3' attattaacagaccgaaacg (Bertheau pers. Komm.) und R-Primer UEA10 5'-3' tccaatgcactaatctgccatatta (Lunt et al. 1996), 0,5µl *Taq*-Polymerase (1U/µl) (Fermentas, Litauen) und 2µl DNA vermengt. Diese Primer amplifizieren ein 904 bp langes mitochondriales COI Produkt. Bei einigen schwer zu amplifizierenden Proben wurde 1 µl BSA zugesetzt. Die PCR bestand aus folgenden Schritten: 3 min 94°C; 30 Zyklen: 94°C 30 sec, 48°C

60 sec, 68°C 90 sec; finaler Extensionsschritt bei 68°C 10 min. Die Kontrolle der erfolgreichen Amplifizierung erfolgte anschließend mittels einer Agarosegelphorese wobei 4 µl des PCR-Produkts verwendet wurden. Weiters wurde eine H₂O_{dd} Negativ-PCR-Probe und eine 100 bp Ladder (Fermentas, Litauen) aufgetragen.

2.2.3 PCR-Aufreinigung

Die Aufreinigung des PCR Amplikons erfolgte unter Verwendung des peqGOLD Cycle-Pure Kit (peqLab). Dabei wurde die gleiche Menge CP Buffer, wie jene der amplifizierten DNA hinzugefügt (in der Regel 21 µl). Dieser Mix wurde vorsichtig durchmischt und auf die Silika-Membran aufgetragen. Durch Zentrifugation (1 min, 10000 rpm) wurde die Säule zweimal mit 600 µl „CG Waschbuffer“ gewaschen. Daraufhin wurde nochmals, ohne Zugabe einer Flüssigkeit zentrifugiert, um einen evtl. Rest an Waschbuffer aus der Silika-Membran zu lösen. Danach wurde die Membran in ein neues Eppendorf gesteckt und das aufgereinigte PCR-Amplikon mit 25 µl „Elution Buffer“ durch Zentrifugation eluiert. Diese aufgereinigte DNA wurde zur Sequenzierung an die University of Chicago (<http://cancer-seqbase.uchicago.edu/>) per Express Sendung geschickt.

2.3 Datenanalyse

Die mtDNA-Sequenzen wurden mit Bioedit Version 7.0.5.3. mittels Verwendung der Funktion ClustalW (Thompson et al. 1994) editiert. Korrekturen wurden manuell vorgenommen. Alle Sequenzen wurden vor der Analyse sorgfältig durchgesehen und mit bekannten Sequenzen unter Bioedit und der Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) verglichen.

Zur Bestimmung des für die Sequenzevolution am besten geeigneten Modells wurde ein Modeltest Version 3.7 angewandt (Posada & Crandall 1998). Dieser Test schlug sowohl das Modell Tamura-Nei Nucleotid Substitution Model TrN+I+G (Tamura & Nei 1993) als auch GTR+I+G als Beste vor. Um die Daten besser mit den Ergebnissen von Avtzis et al. (2008) vergleichen zu können, wurde das Modell TrN+I+G gewählt. Mit diesem wurden schließlich in MEGA 4 (Tamura et al. 2007) die genetischen Distanzen berechnet. Im Anschluss folgte die Konstruktion der phylogenetischen Bäume. Sowohl die Neighbor-Joining- (NJ), Maximum Likelihood- (ML), wie auch Maximum Parsimony- (MP) Bäume ergaben ein ähnliches Bild. Die Robustheit der Topologie wurde mittels 1000 Bootstrapwiederholungen getestet. Es wurde ein Baum mit den eigenen gefundenen Haplotypen (HT) konstruiert und eine phylogenetische Interpretation wurde mit allen vorhandenen HT, also jenen von Avtzis et al. (2008), berechnet. Die Bäume wurden ohne eine „Outgroup“ konstruiert.

Ein Parsimonynetzwerk der HT wurde unter Verwendung von TCS 1.21 (Clement et al. 2000) berechnet. Dabei wurden die Standardregeln von Templeton et al. (1987) angewandt.

ARLEQUIN (Excoffier et al. 2005) wurde zur Kalkulation von genetischen Indizes wie genetische Diversität (H) (Nei 1987), Nukleotid-Diversität (π) (Nei 1987) und die mittlere Anzahl an paarweisen Differenzen (mean number of pairwise differences-MNPD) (Nei 1987) innerhalb der Populationen und innerhalb aller 73 Haplotypen, verwendet. Zur Bestätigung wurden die Diversitätsindizes alleli-scher Reichtum nach der Reduktion (R), durchschnittliche Diversität innerhalb der Populationen (H_s), Gendiversität total (H_t) und Indizes der Populationsstruktur (G_{st}) anhand von CONTRIB, berechnet. Dabei werden die Berechnungen für die Populationen anhand der Anzahl an Individuen der kleinsten Population vorgenommen (Petit et al. 1998).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 In silicio Analysen der COI-Sequenz

Insgesamt gab es entlang des 904 bp langen Amplikons der 208 untersuchten Individuen aus den drei europäischen und zwei russischen Populationen, 70 Mutationen. 34 davon waren informative Mutationen dh. mindestens zwei Individuen haben diese Mutation und 36 sind Singletons dh. nur ein Individuum hat diese Mutation. 73 Haplotypen (HT) (Anhang 1) wurden definiert und davon 58 das erste Mal beschrieben, wobei alle HT in die von Avtzis et al. (2008) berechneten Kladen fielen. Die Differenz von 15 HT, sind ein Teil jener 58 HT, die bereits Avtzis et al. (2008) aufzeigten. Aus praktischen Gründen wurden sie in dieser Arbeit anders tituliert und zur Vergleichbarkeit in Tabelle 3.1 angeführt.

HT1	HT3	HT7	HT9	HT35	HT33	HT31	HT24
PCI-1	PCI-2	PCI-3	PCI-4	PCI-5	PCIIIa-1	PCIIIa-2	PCIIIa-3
HT28	HT47	HT49	HT50	HT55	HT17	HT39	
PCIIIa-4	PCIIIa-5	PCIIIa-6	PCIIIa-7	PCIIIa-22	PCIIId-1	PCIIId-2	

Tabelle 3.1 In dieser Untersuchung gefundene HT, welche äquivalent zu jenen HT von Avtzis et al. (2008) sind.

Zusammen mit der Arbeit von Avtzis et al. (2008) wurden nun 905 Individuen von *P. chalcographus* analysiert und 106 HT gefunden (Anhang 8). Die Anzahl an HT ist dabei weit höher, als bei Untersuchungen anderer europäischer Scolytinae, welchen jedoch zumeist einen weit geringeren Stichprobenumfang hatten (Stauffer et al. 1999, Painter et al. 2007, Horn et al. 2006, Horn et al. 2009).

Gewisse HT konnten nur in gewissen Regionen gefunden werden (z. Bsp.: PCIIIa-7, PCI-6, PCI-4), andere wiederum teilten sich die HT (z. Bsp.: PCIII-1, PCIIIa-3, PCIIIa-1, PCI-1). Die HT der Kladen I und IIIa kamen jedoch in jeder untersuchten Population vor.

Zwischen den HT wurden genetische Distanzen zwischen 0,1 und 2,4% berechnet. Insgesamt konnten 59 Transitionen und 15 Transversionen gefunden werden. Die Verteilung der Basen innerhalb der Haplotypen (Tab. 3.2) entspricht den Werten von Avtzis (2006).

<i>Cytosin</i>	19,09 %
<i>Thymin</i>	36,12 %
<i>Adenin</i>	29,63 %
<i>Guanin</i>	15,16 %

Tabelle 3.2 Basenverteilung der HT von *Pityogenes chalcographus*.

Die Anzahl der Individuen pro HT zeigt Abbildung 3.1. Sechs HT wurden in mehr als zehn Individuen gefunden: PCI - 1 n=21, PCI-4 n=18, PCI - 6 n=16, PCIIIa - 1 n=24, PCIIIa - 7 n=11, PCIII d - 1 n=12. Der häufigste HT PCIIIa-1 erreichte mit 24 Individuen einen Anteil von knapp über 11,5 Prozent (Abb. 3.1, Anhang 1). 47 HT konnten jeweils nur in einem sequenzierten Individuum gefunden werden (Abb. 3.1, Anhang 1 bis 6). 37 Sequenzen wurden durch eine zweite unabhängige PCR bestätigt um Fehler bei der Amplifikation auszuschließen. Insertions bzw. Deletions konnten keine entdeckt werden.

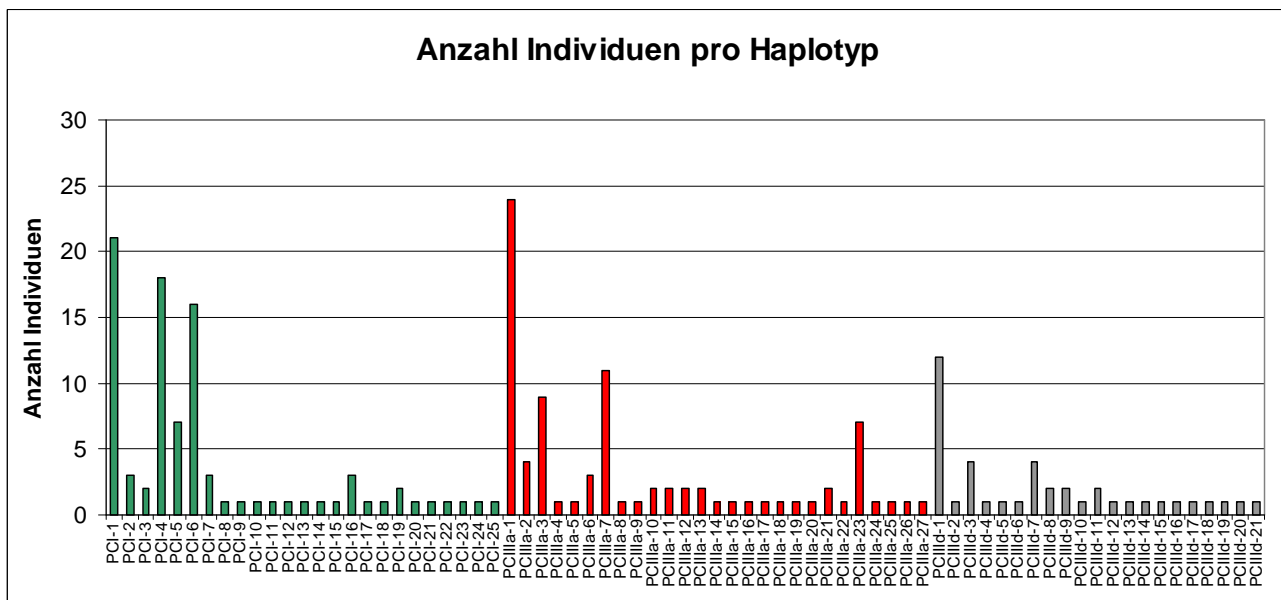


Abbildung 3.1 Verteilung und Anzahl der Individuen pro Klade und HT.

3.2 Phylogenetische Rekonstruktion

Die Beziehungen zwischen den 73 Haplotypen (HT) wurden anhand eines Neighbor Joining-Algorithmus (Saitou & Nei 1987), basierend auf Tamura und Nei (1993), bestimmt. Der berechnete Baum besteht aus 3 Kladen (Abb. 3.2), welche jenen von Avtzis et al. (2008) entsprechen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Farbgebung und Nomenklatur von Avtzis et al. (2008) verwendet.

Für die statistische Sicherheit der Verzweigungspunkte wurde ein Bootstrap-Test mit 1000 Wiederholungen durchgeführt. Klade I war mit 98% sehr gut abgesichert, hingegen war Klade IIIa nur mit 75% und Klade IIIb lediglich mit 52% abgesichert. Auch bei Avtzis (2006) betrug der Wert von Klade IIIb nur knapp 70 %. Die hier konstruierten Bäume (Abb. 3.2, Anhang 8) entsprachen aber generell jenen von Avtzis (2006).

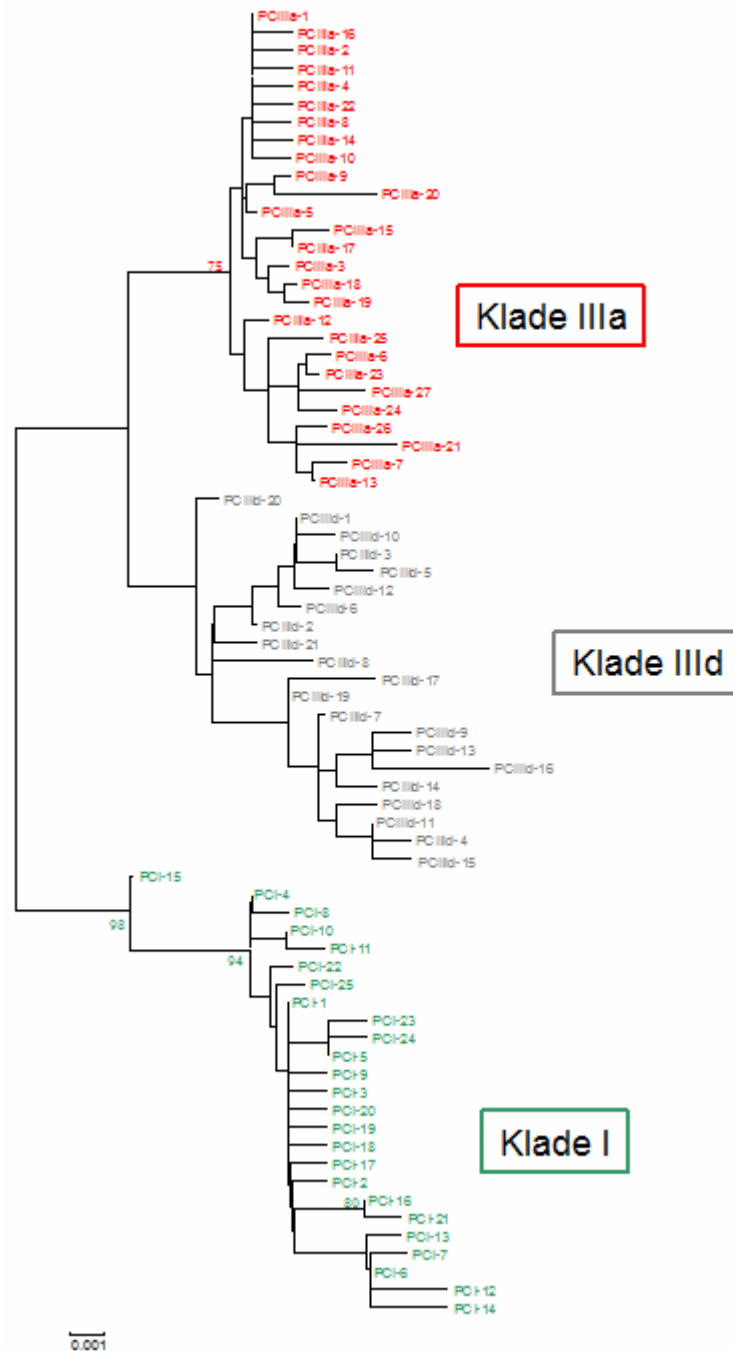


Abbildung 3.2 Neighbour-Joining-NJ Baum der 73 HT von den fünf *Pityogenes chalcographus*-Populationen basierend auf dem Tamura-Nei-Modell (Tamura & Nei 1993) anhand von MEGA4 (Tamura et al. 2007) berechnet. Bootstrap-Werte mit 1000 Wiederholungen werden $\geq 75\%$ angezeigt. Der Balken repräsentiert 0,001 % Nukleotid-Divergenz.

Die mittlere Sequenzdivergenz zwischen den HT beträgt 1,15 % und lag somit etwas unter dem Wert von Avtzis (2006) mit 1,26 %. Den Maximalwert von 2,4 % erreichten die beiden HT PCIIIb-16 und PCI-12 und PCIIIb-16 und PCI-14. Die maximale und minimale Divergenz zwischen und innerhalb

der Kladen ist in Tabelle 3.3 ersichtlich. Die genetische Distanz ist zwischen Klade I und IIIId am größten, dementsprechend ist auch der mittlere Abstand zwischen Klade I und IIIId mit 1,76 % höher als zwischen Klade I und IIIa. Erwartungsgemäß ist dieser Wert zwischen den beiden Kladen IIIa und IIIId mit 1,01 % am niedrigsten. Beim Buchdrucker, *Ips typographus*, im Vergleich, lag die mittlere Sequenzdivergenz bei 0,56 % (Stauffer et al. 1999).

Unterstellt man eine mittlere Sequenzdivergenz der mtDNA von 2,3 % in einer Million Jahre (Brower 1994), kann man rückschließen, dass sich diese beiden Untergruppen vor ungefähr 440 000 Jahren auseinander entwickelt haben. Zwischen Klade I und III gilt demnach ein Zeitraum von ungefähr 750 000 Jahren. Somit haben diese beiden Kladen bereits vor 7 Eiszeiten eine getrennte Entwicklung erfahren (Hewitt 2000) Dies bestätigt die bereits bei Avtzi et al. (2008) entdeckte Tatsache, dass diese beiden Kladen, wovon Klade I im Norden dominiert und Klade IIIa im Süden, bereits früher als die anderen Kladen allopatrisch vorkamen und somit eine getrennte Entwicklung erfahren haben.

		Klade I	Klade IIIa	Klade IIIId
Klade I	<i>max</i>	0,9 %		
	<i>min</i>	0,1 %		
Klade IIIa	<i>max</i>	2,1 %	1,4 %	
	<i>min</i>	0,9 %	0,1 %	
Klade IIIId	<i>max</i>	2,4 %	1,8 %	1,2 %
	<i>min</i>	0,8 %	0,2 %	0,1 %

Tabelle 3.3 Maximale und minimale Sequenzdivergenz zwischen und innerhalb der Kladen.

Die mittlere Sequenzdivergenz innerhalb der Kladen lag für PCI bei 0,37 %, für IIIa bei 0,39 % und für PCIId 0,55 %.

3.3 Verteilung der Haplotypen in Europa

Bei den in dieser Untersuchung 208 analysierten Individuen, aus fünf europäischen bzw. russischen Populationen, zeigte sich, dass in Mitteleuropa alle drei aufgezeigten Kladen vorkommen (Abb. 3.3). Am stärksten vertreten sind jedoch Klade IIIId und Klade IIIa (Abb. 3.3, Anhang 1,2,3,6). In den russischen Populationen hingegen konnten nur Klade I und IIIa (Abb. 3.3, Anhang 1,4,5) entdeckt werden,

wobei Klade I in der östlicheren Population mit Abstand überwiegt. Die anderen 3 Kladen von Avtzis (2006) konnten nicht gefunden werden. Jedoch wurden sie damals nur im Apennin entdeckt.

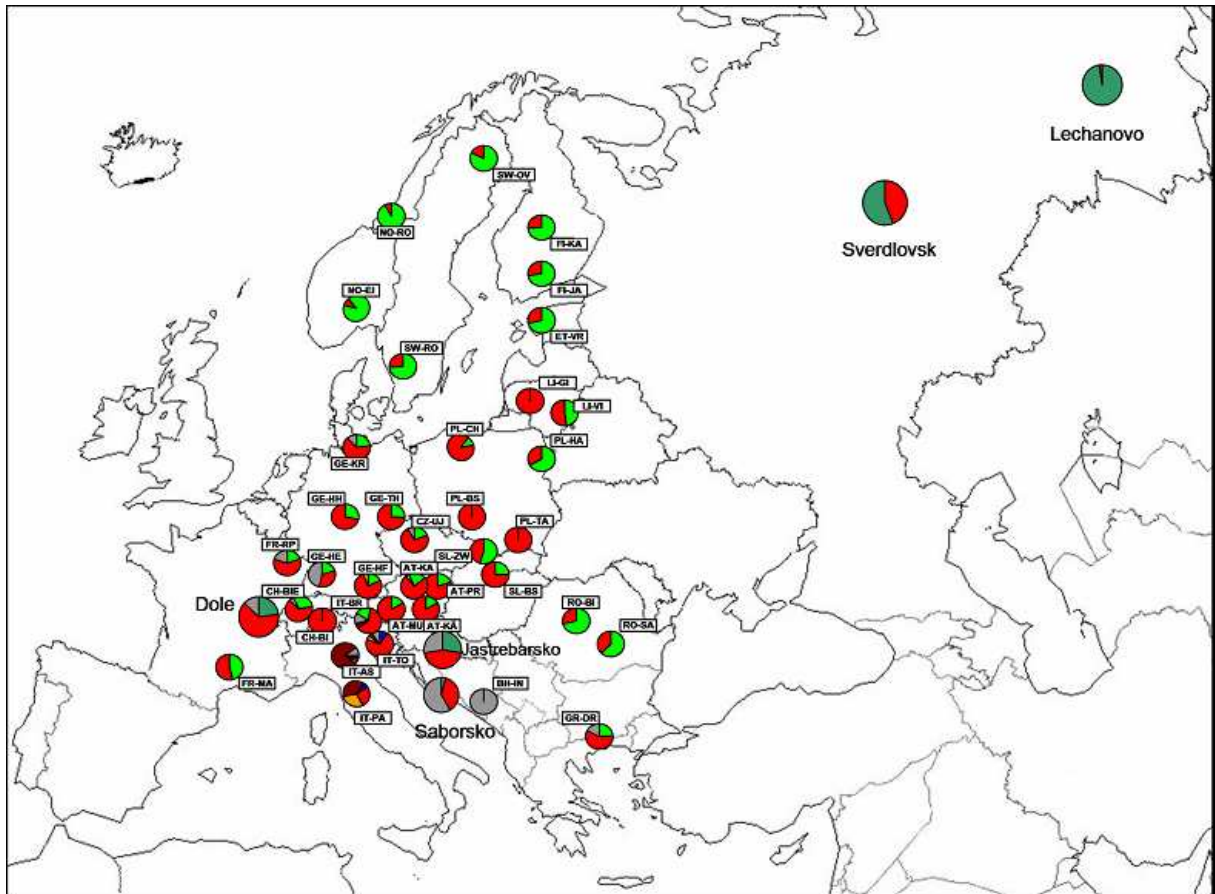


Abbildung 3.3 Verteilung der Haplotypen der 3 Kladen, aufgezeigt durch Sequenzierung des genetischen Markers COI in drei europäischen (Dole, Saborsko, Jastrebarsko) und zwei russischen (Sverdlovsk, Luchanovo) Populationen im Vergleich zu Avtzis et al. (2008),

Die Dinarischen Alpen sind als eines der sieben Refugialgebiete von *Picea abies* in Europa klar definiert (Schmidt-Vogt 1977, Lagercrantz 1990, Tollefsrud et al. 2008). Avtzis et al. (2008) untersuchte 15 Individuen aus dieser Region. In dieser Untersuchung wurden 66 Individuen analysiert um ein klareres Bild über die Verteilung der Haplotypen (HT) in dieser Region zu erhalten. Mit 50 % ist der Anteil an dinarischen HT nicht mehr so hoch wie bei Avtzis et al. (2008) (67%), aber sie sind nach wie vor dominierend in dieser Region.

Über die Phylogeographie von *P. chalcographus* östlich des Urals ist bis dato überhaupt nichts bekannt gewesen. Die Untersuchungen von 47 Individuen aus Lechanovo und 48 aus Sverdlovsk, sollten

deshalb Informationen über diese Region liefern. Es konnten keine neuen Kladen gefunden werden und es wurden nur HT der Klade I und IIIa entdeckt, was auf eine rein europäische Beeinflussung schließen lässt. Klade I dominierte dabei im Osten mit Abstand.

3.4 Diversitätsverteilung

Die höchste Diversität wies die kroatische Population Saborsko (KSa) auf. Die niedrigste Diversität hingegen zeigt die russische Population Luchanovo (RuLu) (Tabelle 3.4). Jedoch haben beide russischen Populationen eine geringere Diversität als die mitteleuropäischen. Innerhalb Europas hat in direkter Nachbarschaft zu KSa, KJa (Jastrebarsko) die niedrigste Diversität. Auch die Diversitätsanalysen anhand von CONTRIB in Tabelle 3.5 zeigten die gleichen Ergebnisse.

Population	N	#HT	Haplotypen	Hd	MNPD	π
FrDo	47	24	PCI-1 (3); PCI-2 (3); PCI-3 (2); PCI-5 (2); PCI-22 (1); PCIIIa-1(9); PCIIIa-2 (3); PCIIIa-3 (6); PCIIIa-4 (1); PCIIIa-11 (1); PCIIIa-12 (1); PCIIIa-13 (1); PCIIIa-14 (1); PCIIIa-15 (1); PCIIIa-16 (1); PCIIIa-17 (1); PCIIIa-18 (1); PCIIIa-19 (1); PCIIIa-20 (1); PCIIIa-22 (1); PCIIIa-1 (2); PCIIIa-3 (2); PCIIIa-4 (1); PCIIIa-5 (1)	0.9408 ± 0.0201	7.628122 ± 3.621904	0.008438 ± 0.004447
KSa	48	27	PCI-5 (1); PCI-24 (1); PCIIIa-1 (1); PCIIIa-6 (3); PCIIIa-7 (5); PCIIIa-21 (1); PCIIIa-23 (4); PCIIIa-24 (1); PCIIIa-25 (1); PCIIIa-26 (1); PCIIIa-27 (1); PCIIIa-1 (8); PCIIIa-7 (3); PCIIIa-8 (2); PCIIIa-9 (2); PCIIIa-10 (1); PCIIIa-11 (2); PCIIIa-12 (1); PCIIIa-13 (1); PCIIIa-14 (1); PCIIIa-15 (1); PCIIIa-16 (1); PCIIIa-17 (1); PC- IIIa-18 (1); PCIIIa-19 (1); PCIIIa- 20 (1); PCIIIa-21 (1)	0.9530 ± 0.0167	7.247340 ± 3.454608	0.008017 ± 0.004242
KJa	18	9	PCI-5 (4); PCI-23 (1); PCIIIa-1 (2); PCIIIa-2 (1); PCIIIa-6 (1); PCIIIa-7 (1); PCIIIa-5 (1); PCIIIa- 7 (6); PCIIIa-21 (1)	0.8562 ± 0.0624	9.444444 ± 4.547986	0.010447 ± 0.005626
RuLu	47	13	PCI-1 (3); PCI-4 (18); PCI-6 (14); PCI-7 (3); PCI-8 (1); PCI-9 (1); PCI-10 (1); PCI-11 (1); PCI-12 (1); PCI-13 (1); PCI-14 (1); PCI- 15 (1); PCIIIa-8 (1)	0.7687 ± 0.0447	2.727105 ± 1.473516	0.003017 ± 0.001809
RuSv	48	14	PCIIIa-1 (14); PCIIIa-2 (1); PCIIIa-3 (3); PCIIIa-9 (1); PCIIIa- 10 (2); PCI-1 (15); PCI-6 (2); PCI- 16 (3); PCI-17 (1); PCI-18 (1); PCI-19 (2); PCI-20 (1); PCI-21 (1); PCI-25 (1)	0.8183 ± 0.0386	7.584220 ± 3.601409	0.008390 ± 0.004422
Gesamt	208	73		0.9547 ± 0.0059	9.422380 ± 4.342848	0.010423 ± 0.005316

Tabelle 3.4 Anzahl und Verteilung der verschiedenen Haplotypen (HT) innerhalb der 3 mitteleuropäischen und 2 russischen Populationen sowie deren Diversitätsindizes: N = Anzahl der untersuchten Individuen; #HT = Anzahl der HT innerhalb der jeweiligen Pop.; Hd = HT-Diversität \pm Standardabweichung-SA; MNPD = mittlere Anzahl an paarweisen Differenzen \pm SA; π = Nukleotid-Diversität \pm SA.

Population	R [18]	Hs	Ht	Gst
FrDo	11,52	0,895	0,971	0,079
Ksa	12,26	0,900	0,980	0,082
Kja	8,00	0,863	0,981	0,120
RuLu	6,00	0,830	0,991	0,162
RuSv	7,00	0,849	0,969	0,124
Gesamt:	9,95	0,867	0,978	0,113

Tabelle 3.5 Diversitätsindizes ermittelt anhand von CONTRIB: R = allelischer Reichtum nach Reduktion; Hs = durchschnittliche Diversität innerhalb der Populationen; Ht = Gendiversität total; Gst = Indizes der Populationsstruktur.

Die Diversitätsindizes für die beiden Populationen aus den Dinarischen Alpen sind relativ hoch, auch im Vergleich zu Avtzis (2006) Ergebnissen. Jastrebarsko gehörte hingegen auch schon bei Avtzis (2006) zu den Populationen, die sehr hohe Diversitätsindizes hatten. Dies ist ein Zeichen, dass hier tatsächlich, gemeinsam mit *P. abies* ein Refugialgebiet für *P. chalcographus* war (Hewitt 1996, Hewitt 2001). Jedoch befanden sich in Südeuropa mehrere Refugialgebiete der Fichte, weshalb auch eine Durchmischung verschiedener Kupferstecherpopulationen, einen Beitrag zu diesem hohen Diversitätswert liefern könnte (Hampe & Petit 2005). Die HT der Klade III d konnten neben dem vermeintlichen Hauptgebiet in den Dinarischen Alpen, auch noch im Süden Europas, sowie nördlich und südlich der westlichen österreichischen und Schweizer Alpen, aber auch im Norden Deutschlands gefunden werden (Avtzis et al. 2008). Auch in der untersuchten französischen Population (FrDo) konnten die HT des Klades III d, nachgewiesen werden. Diese Verbreitung stimmt nicht mit der Phylogeographie der Fichte überein (Tollefsrud et al. 2008).

Ein Refugialgebiet östlich des Urals konnte nicht aufgezeigt werden. Die Hypothese, dass der Kupferstecher gemeinsam mit *Picea abies* var. *obovata* in Sibirien ein Refugium hatte (Schmidt-Vogt 1977), konnte also in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden. Bei der Fichte, trafen sich *Picea abies* var. *obovata* und *Picea abies* var. *europaea* vor ca. 6000 Jahren im russischen Teil Kareliens (Latalowa & van der Knapp 2006). Meine Analyse zeigt, dass *P. chalcographus* von Europa nach Osten expandiert ist, was die starke Abnahme der Diversität von West nach Ost erklärt (Hewitt 1996, Hewitt 2001).

Literaturverzeichnis

- Altenkirch W, Majunke C, Ohnesorge B (2002) Waldschutz auf ökologischer Grundlage. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC, (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489–522.
- Avtzis DN (2006). Race Differentiation of *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera, Scolytidae): An Ecological and Phylogeographic Approach. Dissertation. Universität für Bodenkultur, Wien.
- Avtzis DN, Arthofer W, Stauffer Ch (2008). Sympatric occurrence of diverged mtDNA lineages of *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera, Scolytinae) in Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 94, 331-340.
- Barton NH, Hewitt GM (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, 341, 497-503.
- Beebe & Rowe T, Rowe G (2008). *An Introduction to Molecular Ecology*, 2nd edition. Oxford University Press: Oxford.
- Behura SK (2006). Molecular marker systems in insects: Current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, 15, 3087-3113.
- Bennet KD (1986). The rate of spread and population increase of forest trees during the post-glacial. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London, B* 314, 523–531.
- Bennet KJ (1997). *Evolution and Ecology: The Pace of Live*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Berg GF (1887). Einige Spielarten der Fichte. *Schriften Naturforscher-Gesellschaft Universität Dorpart*.
- Bertheau C, Brockerhoff EG, Roux-Morabito G, Lieutier F, Jactel H (2010). Novel insect-tree associations resulting from accidental and intentional biological 'invasions': A meta-analysis of effects on insect fitness. *Ecological Letters*, 13, 506-515.
- Brower AVZ (1994). Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 14, 6491-6498.
- Brown WM, George M, Wilson AC (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 76, 1967-1971.

- Byers JA (2004). Chemical ecology of bark beetles in a complex olfactory landscape. 89-135. In: Lieutier F, Day KR, Battisti A, Gregoire JC, Evans H, eds. *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Campbell NA, Reece JB (2006), *Biologie*. 6. Auflage. Pearson Studium, München.
- Clary DO, Wolstenholme DR (1985). The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 22, 252-271.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1659.
- Coope GR (1990). The invasion of Northern Europe during the Pleistocene by Mediterranean species of *Coleoptera*. 203–215. In: di Castri F, Hansen AJ, Debusche M, eds. *Biological Invasions in Europe and the Mediterranean Basin*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Crozier RH, Crozier YC (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: Complete sequence and genome organization. *Genetics*, 133, 97-117.
- Dapporto L (2010). Speciation in Mediterranean refugia and post-glacial expansion of *Zerynthia polyxena* (*Lepidoptera*, *Papilionidae*). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 48, 229-237.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) ARLEQUIN (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Fedorovic F (1876). Neue Beobachtungen der sibirischen Fichte *Picea obovata* Ledeb. (russ.). Lesn. Zurn.
- Führer E (1976). Fortpflanzungsbiologische Unverträglichkeit beim Kupferstecher (*Pityogenes chalcographus* L.) - Ein neuer Ansatz zur Borkenkäferbekämpfung?. *Forstarchiv*, 114-117.
- Führer E (1978). Rassendifferenzierung bei *Pityogenes chalcographus* L. (Col., Scolytidae) I. Morphologische Merkmale. *Journal of Applied Entomology*, 86, 392-402.
- Hampe A, Petit RJ (2005). Conserving biodiversity under climate change: The rear edge matters. *Ecology Letters*, 8, 461–467.
- Hewitt GM (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58, 247-276.
- Hewitt GM (1999). Postglacial recolonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68, 87-112.
- Hewitt GM (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907-913.

- Hewitt GM (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10, 537-549.
- Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J, Crandall KA, Graham CH, Johnson JB, Rissler L, Victoriana PF, Yoder AD (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 291-301.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*?—A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters* 281, 215-220.
- Horn A, Roux-Morabito G, Kerdelhue C (2006). Phylogeographic structure and past history of the circum-Mediterranean species *Tomicus destruens* Woll. (Coleoptera, Scolytinae). *Molecular Ecology*, 15, 1603-1615.
- Horn A, Stauffer C, Lieutier F, Kerdelhue C (2009). Complex postglacial history of the temperate bark beetle *Tomicus piniperda* L. (Coleoptera, Scolytinae). *Heredity*, 10, 238-247.
- Kirisits T (2004). Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the Ophiostomatoid fungi. 181-235. In: Lieutier F, Day KR, Battisti A, Gregoire JC, Evans H, eds. *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA (2007). *Genetik*, 8. aktualisierte Auflage. Pearson Education Deutschland GmbH, München.
- Krutovskii KV, Bergmann F (1995). Introgressive hybridization and phylogenetic relationship between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Sibirian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. *Heredity*, 74, 474-480.
- Lagercrantz U, Ryman N (1990). Genetic structure of Norway Spruce (*Picea abies*): Concordance of morphological and allozymic variation. *Evolution*, 44, 38-53.
- Latalowa M, van der Knapp WO (2006). Late Quaternary expansion of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. in Europe according to pollen data. *Quaternary Science Reviews*, 25, 2780-2805.
- Ledebour CF (1833) *Flora Altaica IV*. Berlin.
- Lieutier F, Day KR, Battisti A, Gregoire JC, Evans H, eds. (2004). *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: Evolutionary patterns and conserved primers for phylogeographic studies. *Insect Molecular Biology*, 5, 153-165.

- Mehner T, Pohlmann K, Elkin C, Monaghan MT, Nitz B, Freyhof J (2010). Genetic population structure of sympatric and allopatric populations of Baltic ciscoes (*Coregonus albula* complex, Teleostei, Coregonidae). *BMC Evolutionary Biology*, 10, 85.
- Nei M (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, USA.
- Orlov AJ (1955). *Nadelwälder des Amgun-Bureja-Gebietes* (russ.). Akademie der Wissenschaften USSR, Moskau.
- Painter JN, Siitonen J, Hanski I (2007). Phylogeographical patterns and genetic diversity in three species of Eurasian boreal forest beetles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91, 267–279.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, 12, 844–855.
- Pfeffer A (1994): Zentral- und westpaläarktische Borken- und Kernkäfer (Coleoptera: Scolytidae, Platypodidae). *Entomologica Basiliensia*, 17.
- Posada D, Crandall KA (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817-818.
- Pravdin LF (1975). *Picea abies* (L.) and *P. obovata* Ledeb. in the USSR. Nauka Publ., Moscow (Russian).
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology & Evolution*, 4, 406–425.
- Schmidt-Vogt H (1977). *Die Fichte*. Band 1. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Schmidt-Vogt H (1991). *Die Fichte*. Band 2,3. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Schwenke W (1974). *Die Forstschädlinge Europas*, Band 2. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Schwerdtfeger F (1957). *Waldkrankheiten*. Zweite Auflage. Verlag Paul Marey, Hamburg und Berlin.
- Simon S, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994). Evolution, weighting, phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651-701.
- Stauffer C, Lakatos F, Hewitt GM (1999). Phylogeography and postglacial colonization of *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). *Molecular Ecology*, 8, 763–773.
- Tamura K, Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of the mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512–526.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.

- Templeton AR, Boerwinkle E, Sing CF (1987). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping: I. basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117, 343–351.
- Teplouchoff T (1868). Ein Beitrag zur Kenntnis der sibirischen Fichte-*Picea obovata* Ledebour (deutsch). *Bulletin Soc. Nat. Moscou* 3, 244-252.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- Tollefsrud MM, Kissling R, Gugerli F, Johnsen Ø, Skrøppa T, Cheddadi R, van der Knapp WO, Latalowa M, Terhürne-Berson R, Litt T, Geburek T, Brochmann Ch, Sperisen Ch (2008). Genetic consequences of glacial survival and postglacial colonization in Norway spruce: Combined analysis of mitochondrial DNA and fossil pollen. *Molecular Ecology*, 17, 4134-4150.
- Tollefsrud MM, Sønstebø JH, Brochmann C, Johnsen Ø, Skrøppa T, Vendramin GG (2009). Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies*. *Heredity*, 102, 549-562.
- Tzedakis PC, Bennet KD, Magri D (1994). Climate and the pollen record. *Nature*, 370, 513.
- Virdee SR, Hewitt GM (1994). Clines for hybrid dysfunction in a grasshopper hybrid zone. *Evolution*, 48, 392–407.
- Weigerstorfer D (2003). Woher kommen plötzlich die Käfer?. *FVA-einblick*, 2, 1-2.
- Werren, J.H., Baldo, L., and Clark, M.E. (2008) *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 741–751.
- Williams D, Dunkerley D, DeDeckker P, Kershaw P, Chappell M (1998). *Quaternary Environments*. Second Edition. Oxford University Press, Oxford.
- Willis KJ, Whittaker RJ (2000). Perspectives paleoecology: The refugial debate. *Science*, 287, 1406-1407.
- Zhoa X, Li N, Guo W, Hu X, Liu Z, Gong G, Wang A, Feng J, Wu C (2004). Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Heredity*, 93, 399-403.

4 Anhang

4.1 Haplotypen und deren Anteil über die fünf Populationen mit den zugehörigen Individuen.

HT	Individuen	N	Anteil [%]
PCI-1	RuSv7, RuSv9b, RuSv13, RuSv1, RuSv3, RuSv4, RuSv14, RuSv20, RuSv21, RuSv31, RuSv32, RuSv35, RuSv36, RuSv37, RuSv39, RuLu5, RuLu29, RuLu31, FrDo21, FrDo25, FrDo38	21	10,1
PCI-2	FrDo5, FrDo32, FrDo46	3	1,44
PCI-3	FrDo10, FrDo37	2	0,96
PCI-4	RuLu1, RuLu4, RuLu8, RuLu10, RuLu12, RuLu16, RuLu17, RuLu18, RuLu21, RuLu22, RuLu23, RuLu24, RuLu33, RuLu37, RuLu43, RuLu45, RuLu46, RuLu47	18	8,65
PCI-5	FrDo8, FrDo42, KJa2, KJa10, KSa40, 34K13, 34K19	7	3,36
PCI-6	RuLu2, RuLu9, RuLu13, RuLu14, RuLu15, RuLu19, RuLu20, RuLu27, RuLu32, RuLu34, RuLu39, RuLu41, RuLu42, RuLu44, RuSv, 42, RuSv44	16	7,69
PCI-7	RuLu26, RuLu30, RuLu38	3	1,44
PCI-8	RuLu25	1	0,48
PCI-9	RuLu3	1	0,48
PCI-10	RuLu48	1	0,48
PCI-11	RuLu11	1	0,48
PCI-12	RuLu35	1	0,48
PCI-13	RuLu28	1	0,48
PCI-14	RuLu7	1	0,48
PCI-15	RuLu6	1	0,48
PCI-16	RuSv29, RuSv47, RuSv48	3	1,44
PCI-17	RuSv33	1	0,48
PCI-18	RuSv27	1	0,48
PCI-19	RuSv11, RuSv34	2	0,96
PCI-20	RuSv30,	1	0,48
PCI-21	RuSv28	1	0,48
PCI-22	FrDo14	1	0,48

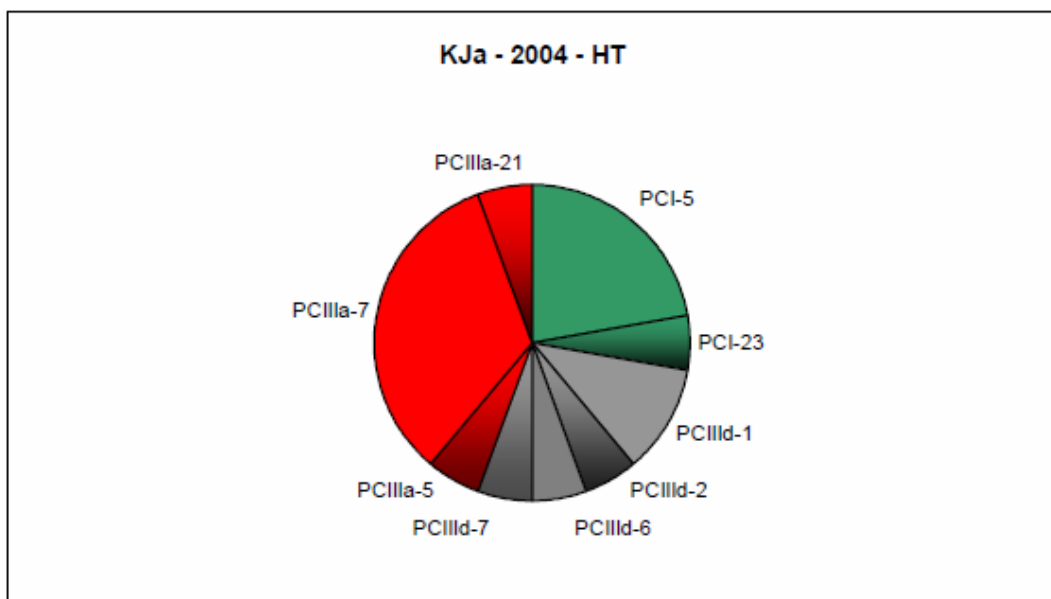
PCI-23	KJa4	1	0,48
PCI-24	KSa21	1	0,48
PCI-25	RuSv15	1	0,48
	PCI – Gesamt:	91	43,75
PCIIIa-1	RuSv8, RuSv10, RuSv12, RuSv16, RuSv17, RuSv19, RuSv22, RuSv25, RuSv26, RuSv38, RuSv40, RuSv41, RuSv45, RuSv46, FrDo3, FrDo20, FrDo23, FrDo26, FrDo28, FrDo35, FrDo36, FrDo40, FrDo47, KSa14	24	11,5
PCIIIa-2	RuSv5, FrDo15, FrDo4, FrDo7	4	1,92
PCIIIa-3	RuSv2, RuSv7, RuSv43, FrDo12, FrDo16, FrDo6, FrDo27, FrDo29, FrDo45	9	4,33
PCIIIa-4	FrDo17	1	0,48
PCIIIa-5	KJa1	1	0,48
PCIIIa-6	KSa6, KSa11, KSa18	3	1,44
PCIIIa-7	KJa3, KJa8, KJa9, KSa7, KSa16, Ksa28, Ksa31, Ksa36, 34K11, 34K14, 34K16	11	5,29
PCIIIa-8	RuLu36	1	0,48
PCIIIa-9	RuSv6	1	0,48
PCIIIa-10	RuSv18, RuSv23	2	0,96
PCIIIa-11	FrDo14	1	0,48
PCIIIa-12	FrDo2	1	0,48
PCIIIa-13	FrDo18	1	0,48
PCIIIa-14	FrDo13	1	0,48
PCIIIa-15	FrDo19	1	0,48
PCIIIa-16	FrDo24	1	0,48
PCIIIa-17	FrDo33	1	0,48
PCIIIa-18	FrDo39	1	0,48
PCIIIa-19	FrDo43	1	0,48
PCIIIa-20	FrDo22	1	0,48
PCIIIa-21	KJa7, KSa29	2	0,96

PCIIIa-22	FrDo11	1	0,48
PCIIIa-23	KSa22, KSa24, KSa30, KSa33	4	1,92
PCIIIa-24	KSa39	1	0,48
PCIIIa-25	KSa8	1	0,48
PCIIIa-26	KSa27	1	0,48
PCIIIa-27	KSa32	1	0,48
	PCIIIa – Gesamt:	78	37,5
PCIIIId-1	FrDo31, FrDo44, KP35, KSa9, KSa10, KSa4, KSa26, KSa35, KSa37, KSa38, 34K17, 34K20	12	5,77
PCIIIId-2	34K18	1	0,48
PCIIIId-3	FrDo9, FrDo30	2	0,96
PCIIIId-4	FrDo41	1	0,48
PCIIIId-5	FrDo1	1	0,48
PCIIIId-6	KJa5	1	0,48
PCIIIId-7	KJa6, KJa15, KJa19, KSa3	4	1,92
PCIIIId-8	KSa1, KSa5	2	0,96
PCIIIId-9	KP36, KP41	2	0,96
PCIIIId-10	KP37	1	0,48
PCIIIId-11	KP38, KP39	2	0,96
PCIIIId-12	KP42	1	0,48
PCIIIId-13	KSa20	1	0,48
PCIIIId-14	KSa12	1	0,48

PCIIIId-15	KP33	1	0,48
PCIIIId-16	KP34	1	0,48
PCIIIId-17	KSa17	1	0,48
PCIIIId-18	KSa23	1	0,48
PCIIIId-19	KSa13	1	0,48
PCIIIId-20	KSa25	1	0,48
PCIIIId-21	KSa34	1	0,48
		PCIIIId – Gesamt:	39 18,75

4.2 Verteilung der Haplotypen der Population KJa.

PCI-5	PCI-23	PCIIIa-1	PCIIIa-2	PCIIIa-6	PCIIIa-7	PCIIIa-5	PCIIIa-7	PCIIIa-21	
4	1	2	1	1	1	1	6	1	18 [N]
22,2%	5,6%	11,1%	5,5%	5,6%	5,6%	5,6%	33,3%	5,6%	100%
KJa2	KJa4	34K17	34K18	KJa5	KJa6	KJa1	KJa3	KJa7	
34K13		34K20					KJa8		
34K19							KJa9		
KJa10							34K11		
							34K14		
							34K16		
27,8%		27,8%				44,4%			



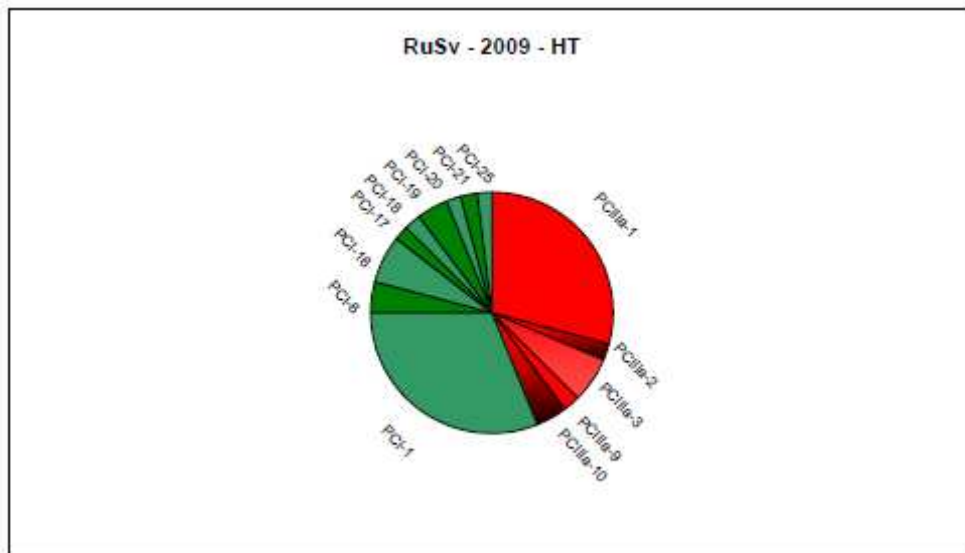
4.3 Verteilung der Haplotypen der Population KSa.

PCI-5	PCI-24	PCIIa-3	PCIIa-6	PCIIa-7	PCIIa-21	PCIIa-23	PCIIa-24	PCIIa-25	PCIIa-26	PCIIa-27
1	1	1	3	5	1	4	1	1	1	1
2,1%	2,1%	2,1%	6,3%	10,4%	2,1%	8,3%	2,1%	2,1%	2,1%	2,1%
KSa40	KSa21	KSa14	KSa6	KSa7	KSa29	KSa22	KSa39	KSa8	KSa27	KSa32
			KSa11	KSa16		KSa24				
			KSa18	KSa28		KSa30				
				KSa31		KSa33				
				KSa36						
4,2%		37,5%								

PC IIIId-1	PC IIIId-7	PC IIIId-8	PC IIIId-9	PC IIIId-10	PC IIIId-11	PC IIIId-12	PC IIIId-13	PC IIIId-14	PC IIIId-15	PC IIIId-16	PC IIIId-17	PC IIIId-18	PC IIIId-19	PC IIIId-20	PC IIIId-21	
8	3	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	48 [N]
16,7 %	6,3 %	4,2 %	4,2 %	2,1 %	4,2 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	100 %
KP3 5	KSa3	KSa1	KP3 6	KP3 7	KP3 8	KP4 2	KSa2 0	KSa1 2	KP3 3	KP3 4	KSa1 7	KSa2 3	KSa1 3	KSa2 5	KSa3 4	
KSa9	KSa1 5	KSa5	KP4 1		KP3 9											
KSa1 0	KSa1 9															
KSa4																
KSa2 6																
KSa3 5																
KSa3 7																
KSa3 8																
58,3%																

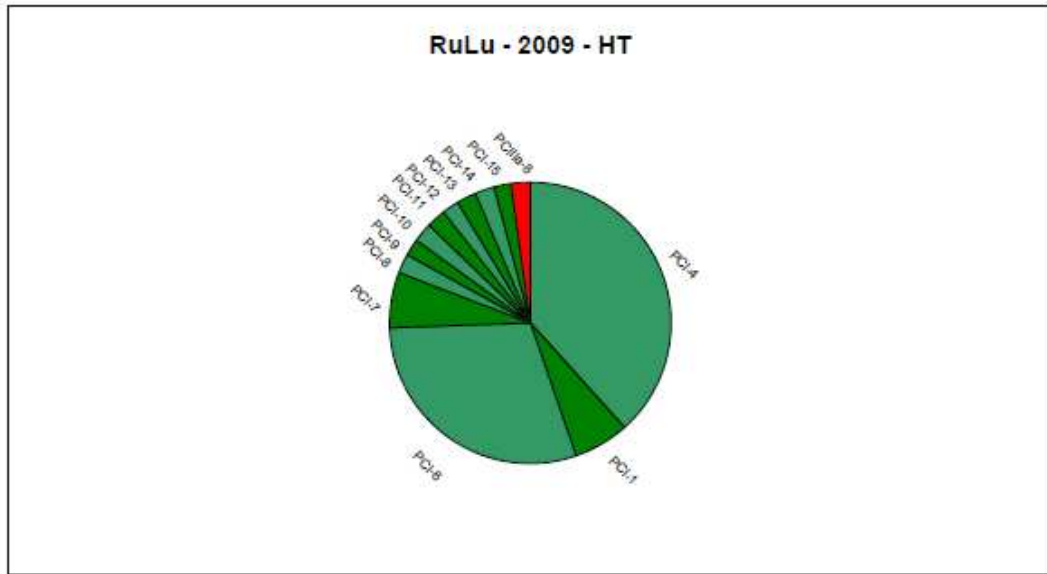
4.4 Verteilung der Haplotypen der Population RuSv.

PCI-Ia-1	PCI-Ia-2	PCI-Ia-3	PCI-Ia-9	PCI-Ia-10	PCI-1	PCI-6	PCI-16	PCI-17	PCI-18	PCI-19	PCI-20	PCI-21	PCI-25	
14	1	3	1	2	15	2	3	1	1	2	1	1	1	48
29,2 %	2,1%	6,3%	2,1%	4,2%	31,3 %	4,2%	6,3%	2,1%	2,1%	4,2%	2,1%	2,1%	2,1%	100 %
RuSv 8	RuSv 5	RuSv 2	RuSv 6	RuSv 18	RuSv 7	RuSv 42	RuSv 29	RuSv 33	RuSv 24	RuSv 11	RuSv 30	RuSv 28	RuSv 15	
RuSv 10		RuSv 27		RuSv 23	RuSv 9b	RuSv 44	RuSv 47			RuSv 34				
RuSv 12		RuSv 43			RuSv 13		RuSv 48							
RuSv 16					RuSv 1									
RuSv 17					RuSv 3									
RuSv 19					RuSv 4									
RuSv 22					RuSv 14									
RuSv 25					RuSv 20									
RuSv 26					RuSv 21									
RuSv 38					RuSv 31									
RuSv 40					RuSv 32									
RuSv 41					RuSv 35									
RuSv 45					RuSv 36									
RuSv 46					RuSv 37									
					RuSv 39									
43,7%					56,3%									



4.5 Verteilung der Haplotypen der Population RuLu.

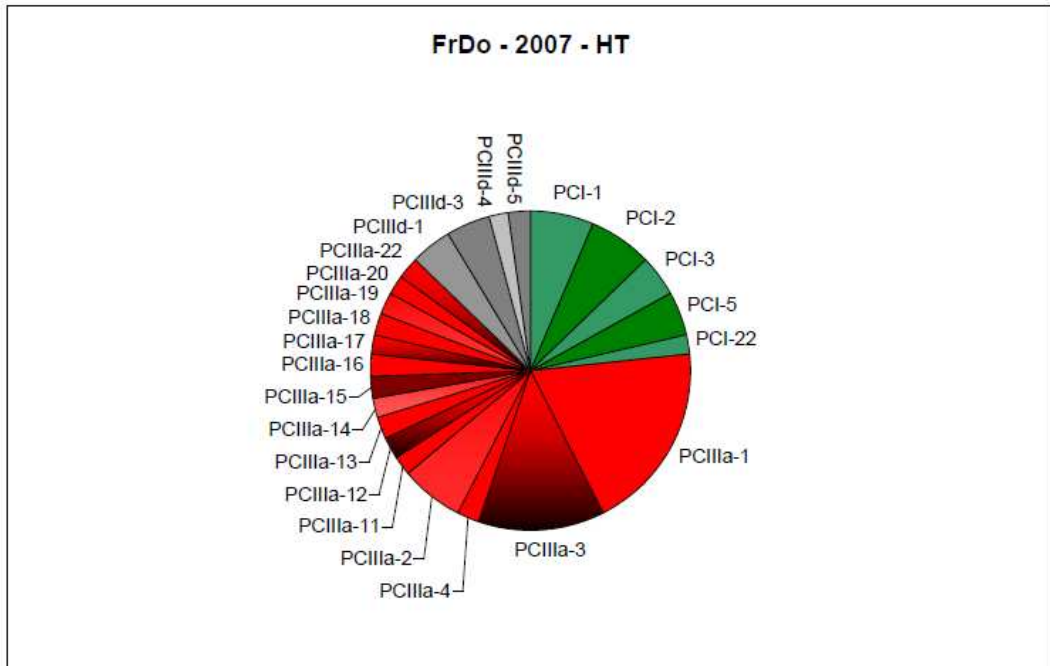
PCI-1	PCI-4	PCI-6	PCI-7	PCI-8	PCI-9	PCI-10	PCI-11	PCI-12	PCI-13	PCI-14	PCI-15	PCIIa-8	
3	18	14	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	47
6,4%	38,3%	29,8%	6,4%	2,1%	2,1%	2,1%	2,1%	2,1%	2,1%	2,1%	2,1%	2,1%	100%
RuLu5	RuLu1	RuLu2	RuLu 26	RuLu25	RuLu3	RuLu48	RuLu11	RuLu35	RuLu28	RuLu7	RuLu6	RuLu36	
RuLu29	RuLu4	RuLu9	RuLu 30										
RuLu31	RuLu8	RuLu 13	RuLu 38										
	RuLu10	RuLu 14											
	RuLu12	RuLu 15											
	RuLu16	RuLu 19											
	RuLu17	RuLu 20											
	RuLu18	RuLu 27											
	RuLu21	RuLu 32											
	RuLu22	RuLu 34											
	RuLu23	RuLu 39											
	RuLu24	RuLu 41											
	RuLu 33	RuLu 42											
	RuLu 37	RuLu 44											
	RuLu 43												
	RuLu 45												
	RuLu 46												
	RuLu 47												
97,9%												2,1%	



4.6 Verteilung der Haplotypen der Population FrDo.

PCI-Ia-1	PCI-Ia-2	PCI-Ia-3	PCI-Ia-4	PCI-Ia-11	PCI-Ia-12	PCI-Ia-13	PCI-Ia-14	PCI-Ia-15	PCI-Ia-16	PCI-Ia-17	PCI-Ia-18	PCI-Ia-19	PCI-Ia-20	PCI-Ia-22
9	3	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19,1 %	6,4 %	12,8 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %	2,1 %
FrDo 3	FrDo 4	FrDo 6	FrDo 17	FrDo 34	FrDo 2	FrDo 18	FrDo 13	FrDo 19	FrDo 24	FrDo2 33	FrDo 39	FrDo 43	FrDo 22	FrDo 11
FrDo 20	FrDo 7	FrDo 12	63,8%											
FrDo 23	FrDo 15	FrDo 16												
FrDo 26		FrDo 27												
FrDo 28		FrDo 29												
FrDo 35		FrDo 45												
FrDo 36														
FrDo 40														
FrDo 47														

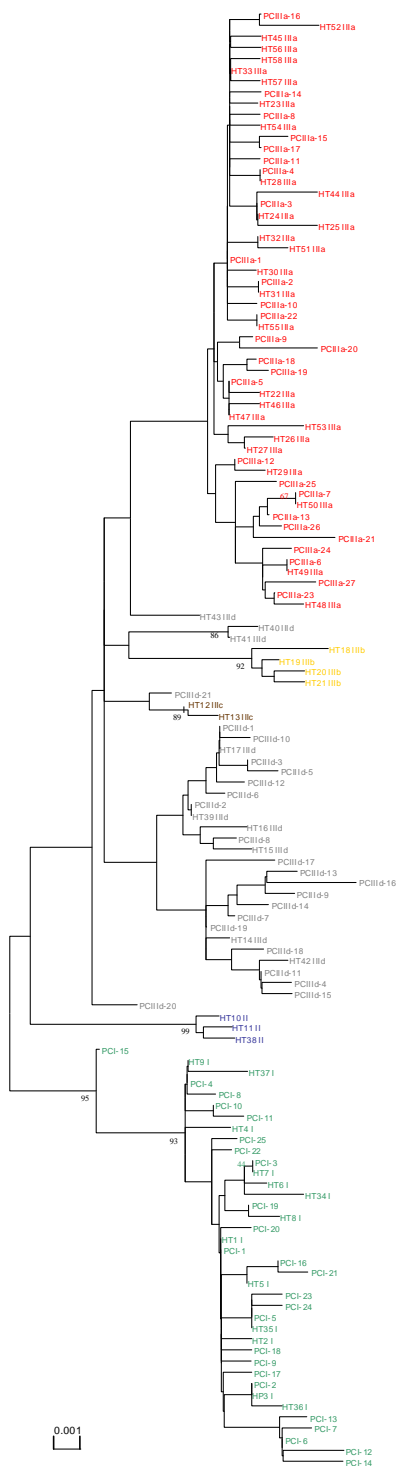
PCI-1	PCI-2	PCI-3	PCI-5	PCI-22	PCIIIId-1	PCIIIId-3	PCIIIId-4	PCIIIId-5	
3	3	2	2	1	2	2	1	1	47
6,4 %	6,4 %	4,3 %	4,3 %	2,1 %	4,3 %	4,3 %	2,1 %	2,1 %	100 %
FrDo21	FrDo5	FrDo10	FrDo8	FrDo14	FrDo31	FrDo9	FrDo41	FrDo1	
FrDo25	FrDo32	FrDo37	FrDo42		FrDo44	FrDo30			
FrDo38	FrDo46								
23,4 %					12,8 %				



4.7 Allgemeine Angaben zu den Populationen

Nr.:	Code	Land	Ort	Wirt	Latitude	Longitude	Anzahl Ind.	Sammeldatum
1	34K	Kroatien	Jastrebarsko	Picea abies	45°40	15°39	18	2004
2	113K	Kroatien	Saborsko	Picea abies	44°59	15°28	48	2009
3	109RU	Rusland	Luchanovo	Picea abies	56°21	85°02	47	2009
4	110RU	Rusland	Sverdlovsk	Picea abies	59°00	61°55	48	2009
5	116FR	Frankreich	Dole	Picea abies	47°05	05°29	47	2007

4.8 Ungewurzelter Neighbor-Joining-NJ Baum aller 106 Haplotypen (äquivalente Haplotypen von Avtzis et al. (2008) werden 2fach angezeigt) basierend auf dem Tamura Nei-Modell anhand von MEGA konstruiert. Bootstrap-Werte (1000 Wiederholungen) ≥ 75 werden angezeigt. Der Balken links unten repräsentiert 0,001 % Nukleotid-Divergenz.



NJ Tree T&N
 1000 replicates
 MEGA
 With DA
 sequences

4.9 TCS-Netzwerk, eine Linie repräsentiert eine Mutation.

